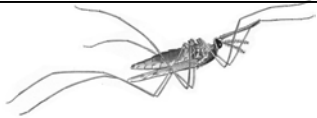


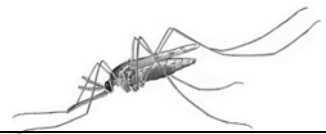
Aus dem Institut für
Medizinische Parasitologie
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Eingereicht über das
Institut für Parasitologie
der Justus-
Liebig-Universität Gießen



Molekularbiologische Differenzierung
der Geschwisterarten des *Anopheles claviger*-Komplexes
und Untersuchungen zur Populationsgenetik von
***Anopheles claviger* s.s. Meigen 1804 (Diptera, Culicidae)**
auf der Basis von Mutationen in der mitochondrialen DNA

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
im Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



Eingereicht von
ANJA STERNBERG

Gießen 2004

Aus dem Institut für
Medizinische Parasitologie
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Betreuer: Prof. Dr. W. A. Maier

Eingereicht über das
Institut für Parasitologie
der Justus-
Liebig-Universität Gießen

Im Fachbereich vertreten durch:
Prof. Dr. H. Zahner

**Molekularbiologische Differenzierung
der Geschwisterarten des *Anopheles claviger*-Komplexes
und Untersuchungen zur Populationsgenetik von
Anopheles claviger s.s. Meigen 1804 (Diptera, Culicidae)
auf der Basis von Mutationen in der mitochondrialen DNA**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
im Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
ANJA STERNBERG
Tierärztin aus Bonn

Gießen 2004

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
Der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. A. Maier

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Zahner

Tag der mündlichen Prüfung: 03. Juni 2004

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Artenkomplexe	3
2.1.1	Der <i>Anopheles claviger</i> -Komplex	4
2.1.2	Identifizierung von Geschwisterarten	7
2.1.2.1	Morphologische und ökologische Artdifferenzierung	7
2.1.2.2	Biochemische und cytotaxonomische Artdifferenzierung	10
2.1.2.3	Molekularbiologische Artdifferenzierung	11
2.2	Populationsgenetische Untersuchungen	14
2.2.1	Molekularbiologische Differenzierung von Populationen	14
3	Material und Methoden	17
3.1	Etablierung einer artdiagnostischen PCR für die Geschwisterarten des <i>An. claviger</i> -Komplexes	17
3.1.1	Prinzip	17
3.1.2	Herkunft und Bestimmung der <i>Anopheles</i> -Mücken	17
3.1.3	DNA-Extraktion	19
3.1.3.1	DNA-Extraktion nach COLLINS et al. (1987)	19
3.1.3.2	DNA-Extraktion nach GUY und STANEK (1991)	21
3.1.4	PCR	21
3.1.4.1	Amplifikation der ITS2-Region der rDNA	23
3.1.4.2	Agarose-Gelelektrophorese	24
3.1.5	Aufreinigung der PCR-Produkte	26
3.1.6	Sequenzierung der PCR-Produkte	26
3.1.7	Auswertung der Sequenzdaten	27
3.1.8	Konstruktion und Austestung artspezifischer Primer	27
3.2	Untersuchung des Isolationsgrades von <i>An. claviger</i> s.s.-Populationen mittels PCR-SSCP	30
3.2.1	Prinzip	30
3.2.2	Herkunft der <i>Anopheles</i> -Mücken	32

3.2.3	Amplifikation der auf Punktmutationen zu untersuchenden DNA-Abschnitte	34
3.2.3.1	Amplifikation der ND4-Region der mitochondrialen DNA von <i>An. claviger</i> s.s.	34
3.2.3.2	Amplifikation der CO1-Region der mitochondrialen DNA von <i>An.</i> <i>claviger</i> s.s.	35
3.2.4	Restriktionsenzymatischer Abbau der ND4- und der CO1-Region	36
3.2.4.1	Restriktionsspaltung der ND4-Region	37
3.2.4.2	Restriktionsspaltung der CO1-Region	37
3.2.5	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	38
3.2.5.1	PAGE der ND4-Spaltprodukte	39
3.2.5.2	PAGE der CO1-Spaltprodukte	39
3.2.5.3	Silberfärbung	40
3.2.6	SSCP-Analyse	41
4	Ergebnisse	42
4.1	Etablierung und Evaluierung einer artspezifischen PCR für die Geschwisterarten des <i>An. claviger</i> -Komplexes	42
4.1.1	ITS2-Region der <i>An. claviger</i> -Geschwisterarten	42
4.1.2	Konstruktion von artspezifischen Primern für den <i>An. claviger</i> -Komplex	43
4.1.3	Multiplex-PCR	46
4.1.4	Spezifität der artdiagnostischen PCR	47
4.1.5	Identifizierung von Individuen des <i>An. claviger</i> -Komplexes	49
4.2	Populationsdifferenzierung von <i>An. claviger</i> s.s. mittels PCR-SSCP	51
4.2.1	PCR-SSCP der ND4-Region	51
4.2.1.1	Amplifikation der ND4-Region	51
4.2.1.2	Sequenzierung der ND4-Region	52
4.2.1.3	Restriktionsspaltung der ND4-Region	54
4.2.1.4	PAGE der Spaltprodukte der ND4-Region	56
4.2.1.5	Sequenzvergleich der ND4-Region ausgewählter Populationen	69
4.2.2	Etablierung der PCR-SSCP für die CO1-Region von <i>An. claviger</i> s.s.	71

4.2.2.1	Amplifikation der CO1-Region	71
4.2.2.2	Sequenzierung der CO1-Region	73
4.2.2.3	Restriktionsspaltung der CO1-Region	74
4.2.2.4	PAGE der Spaltprodukte der CO1-Region	76
5	Diskussion	82
6	Zusammenfassung	93
7	Summary	95
8	Literatur	97
9	Abbildungsverzeichnis	114
10	Tabellenverzeichnis	117

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CO1	Cytochrom-Oxidase, Untereinheit 1
ddNTPs	Didesoxynukleosidtriphosphate
dH ₂ O	Aqua destillata
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSS	denatured single strand
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
ETS	external transcribed spacer
IGS	intergenic spacer
ITS	internal transcribed spacer
MDE	mutation detection enhancer
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	messenger RNA
mtRNA	mitochondrial ribonucleic acid
NaCl	Natriumchlorid
ND4	Natriumdehydrogenase, Untereinheit 4
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction
PCR-RFLP	PCR-restriction fragment length polymorphism
RAPD-PCR	random amplified polymorphic DNA-PCR
rDNA	ribosomal Desoxyribonucleic acid
RNA	ribonucleic acid
RSS	renatured single strand
s.l.	sensu lato
s.s.	sensu stricto
SDS	sodium dodecylsulphate
SSCP	single strand conformation polymorphism analysis
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
U	unit(s)

1. Einleitung

Blutsaugende Arthropoden übertragen zahlreiche Krankheitserreger, die z.T. zu hohen Morbiditäten und Mortalitäten bei verschiedenen Wirbeltieren führen. Vektor-assoziierte Erkrankungen (engl.: „vector-borne diseases“), wie Malaria, Onchozerkose, Trypanosomiasis, Leishmaniose, Filariosen, Borreliose, Gelbfieber, Myxomatose, Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD), Rift-Tal-Fieber, Blauzungkrankheit (Bluetongue disease) u. V. m. stellen nicht nur in den Tropen und Subtropen, sondern zunehmend auch in den gemäßigten Klimazonen eine Bedrohung für eine große Anzahl von Menschen und Tieren dar (TABACHNICK & BLACK 1995).

Eine Möglichkeit, die endemische Übertragung der entsprechenden Pathogene zu verhindern, ist die Vektorkontrolle. Die Grundlagen für eine effiziente und zielgerichtete Vektorkontrolle sind allerdings fundierte und detaillierte Kenntnisse zur Biologie und Ökologie der Überträger sowie schnelle und zuverlässige Verfahren zu ihrer Identifikation. Von großer Bedeutung für die Epidemiologie einer Krankheit sind auch Populationsverschiebungen und –anpassungen auf Seiten des Vektors, die z.B. zu Verhaltensänderungen oder Insektizidresistenzen führen können.

Gerade angesichts der aktuellen Diskussion über „emerging and resurging vector-borne diseases“ im Zusammenhang mit möglichen klimatischen und ökologischen Veränderungen (vgl. z. B. SUTHERST 1993, GRATZ 1999) sollte ein großes Interesse daran bestehen, einheimische potenzielle Vektoren hinsichtlich ihres Auftretens und ihrer Verbreitung zu erfassen und genauestens zu untersuchen. Für Europa handelt es sich bei diesen hauptsächlich um Zecken (Fam. Ixodidae) und Stechmücken (Fam. Culicidae). Während die Zecken aber schon seit zwei Jahrzehnten wieder im Interesse der Wissenschaft stehen, verloren die einheimischen Stechmücken seit dem Verschwinden der Malaria aus Europa in der Mitte des letzten Jahrhunderts an Relevanz. Erst in der jüngeren Vergangenheit erneut aufgetretene autochthone Malariafälle aus Italien, Bulgarien und Griechenland (MAJORI et al. 1999; KAMPEN et al. 2002) sowie verschiedene West-Nil-Fieber-Epidemien bei Menschen und Pferden (HUBÁLEK & HALOUZKA 1999, CDC 2001, MURGUE et al. 2001) verdeutlichen, dass Stechmücken auch in Europa nach wie

vor als Überträger von human- und veterinärmedizinisch bedeutsamen Krankheiten eine Gefahr darstellen können.

Vor diesem Hintergrund war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, einen Beitrag zur Identifizierung von Culiciden zu liefern und ein PCR-System zu etablieren, welches eine eindeutige Identifizierung der Geschwisterarten des *Anopheles claviger*-Komplexes zulässt. Die beiden Geschwisterarten dieses Komplexes, *An. claviger* s.s. und *An. petragani*, sind morphologisch nur im Larven- und Puppenstadium an feinsten Härchen zu differenzieren (DEL VECCHIO 1939; LUPASCU 1941; PEUS 1942; SENEVET & ANDARELLI 1955; COLUZZI 1962 und COLUZZI et al. 1965; MOHRIG 1969; MATHIEU & SCHAFFNER 2001). Nichtsdestoweniger besitzen sie unterschiedliche Lebensweisen, ökologische Ansprüche und Vektorkompetenzen (z. B. KÜHLHORN 1965; POSTIGLIONE et al. 1973).

Eine artdiagnostische PCR zur Identifizierung der beiden Arten muss im wesentlichen zwei Anforderungen erfüllen: (1.) Sie muss absolut spezifisch sein, indem sie nicht nur die beiden Spezies differenziert, sondern auch eine klare Abgrenzung zu weiteren Culiciden garantiert, und (2.) sie sollte eine einfache und schnelle Handhabung gewährleisten, indem ein Schnellverfahren zur DNA-Extraktion zum Einsatz kommt und beide Geschwisterarten in einem einzigen Reaktionsansatz mittels einer Multiplex-PCR alternativ bestimmt werden können.

Die genetische Differenzierung von Populationen des potenziellen Malariavektors *An. claviger* s.s. war ein weiteres Ziel in o. g. Zusammenhang. Eine Streuung von Genen zwischen Populationen stellt die Voraussetzung für die Weitergabe von Eigenschaften wie Vektorkompetenz oder Insektizidresistenz dar. Die Identifikation von Haplotypen bezüglich von Genen der mitochondrialen DNA sollte Aufschluss über den Isolationsgrad bzw. den Genfluss zwischen verschiedenen *An. claviger* s.s.-Populationen geben (Anmerkung: Die mtDNA liegt haploid vor, deshalb spricht man von unterschiedlichen Haplotypen und nicht von Allelen.).

Hierbei sollte die PCR-SSCP, ein sensitives Screening-Verfahren zur Detektion von DNA-Polymorphismen, eingesetzt werden.

2. Literaturübersicht

2.1 Artenkomplexe

Unter einem Artenkomplex versteht man eine Gruppe von Spezies, die morphologisch identisch sind oder sich nur minimal unterscheiden, aber in ihrem Verhalten und in ihrem biologischen Charakter durchaus voneinander abweichen können (KOEKEMOER et al. 1999). Nichtsdestoweniger sind solche kryptischen oder Geschwisterarten (engl.: sibling species) richtige Arten und daher untereinander reproduktiv isoliert (BULLINI 1984). Geprägt wurde der Begriff „Geschwisterarten“ von MAYR (1967), der solche Arten als „morphologisch ähnliche oder identische natürliche Populationen, die fortpflanzungsisoliert sind“, definierte. BULLINI und COLUZZI (1982) beschreiben die Geschwisterarten eines Artenkomplexes als Repräsentanten unterschiedlicher Stufen der Evolution, die noch keine morphologischen Abweichungen zeigen, d.h. dass die morphologischen Kriterien noch nicht ausreichen, um eine Art zu charakterisieren.

Gerade innerhalb der Gattung *Anopheles* ist die Unterscheidung von Geschwisterarten im Hinblick auf eine präventive Bekämpfung der Malaria oder anderer Krankheiten, deren Überträger sie sein können, von großer Bedeutung.

Der *An. maculipennis*-Komplex (*An. maculipennis* sensu lato = s.l.) wurde z.B. Anfang des letzten Jahrhunderts als eine einzige Art mit europaweiter Verbreitung beschrieben, die als potenzieller Vektor von Malariaparasiten galt. Epidemiologische Studien ergaben jedoch, dass die Erkrankung hauptsächlich in Küstenregionen auftrat, was nicht in Einklang zu bringen war mit dem oftmals starken Vorkommen der Mücken im Inland (KITZMILLER et al. 1967). Dieses Phänomen wurde als „Anophelismus sine Malaria“ bekannt und gab Anlass zur näheren Betrachtung der *Anopheles*-Mücken in diesen Gebieten (FANTINI 1994). Bald darauf wurde erkannt, dass es sich bei *An. maculipennis* um einen Komplex mehrerer Geschwisterarten handelt, die sich u.A. in ihrer Kompetenz, Malariaparasiten zu übertragen, unterscheiden (VAN THIEL 1927; HACKETT & MISSIROLI 1935; BATES & HACKETT 1939; KITZMILLER et al. 1967; WHITE 1978).

Ein weiteres klassisches Beispiel für einen Artenkomplex unter den *Anopheles*-Mücken stellt *An. gambiae* s.l. dar. In diesem in Afrika beheimateten Komplex sind nur zwei der sieben Geschwisterarten effektive Vektoren des Malariaparasiten

Plasmodium falciparum, während die anderen schlechte bzw. gar keine Überträger sind (KOEKEMOER et al. 1999). Zahlreiche weitere Beispiele für isomorphe Geschwisterarten bei Arthropoden mit unterschiedlichen Vektorkompetenzen und anderen Eigenschaften (z.B. der *Simulium damnosum*- oder der *Ixodes ricinus*-Komplex) machen deutlich, wie wichtig eine genaue Spezies-Differenzierung ist.

2.1.1 Der *Anopheles claviger*-Komplex

Bei *An. claviger* s.l. handelt es sich um einen Artenkomplex innerhalb der Familie Culicidae, der sich aus zwei Geschwisterarten, *An. claviger* s.s. MEIGEN 1804 und *An. petragrani* DEL VECCHIO 1939, zusammensetzt. Die beiden Formen stellen reproduktiv isolierte Spezies dar (COLUZZI 1962) und können lediglich anhand der Morphologie der unreifen Entwicklungsstadien (COLUZZI et al. 1965; ZAMBURLINI & CARGNUS 1998; SCHAFFNER et al. 2000) sowie biochemischer Merkmale (CIANCHI et al. 1980, 1981) differenziert werden. *An. claviger* s.s. ist in den westlichen paläarktischen Regionen heimisch und scheint sich neben ihrer ursprünglichen Verbreitung, dem Norden Europas, inzwischen zusätzlich den südeuropäischen Raum erschlossen zu haben (Abb. 1), wo sie Quellen, Brunnen und Zisternen als Brutstätten nutzt. *An. claviger* s.s. wurde mittlerweile in ganz Europa und darüber hinaus im Osten bis Afghanistan, im Südosten bis in den mittleren Osten und im Süden und Südwesten bis nach Nordafrika nachgewiesen. Auf den Balearen, Malta und Sardinien scheint die Art nicht vorzukommen (RAMSDALE & SNOW 2000). *An. petragrani* ist thermophiler und kommt im wesentlichen im mediterranen Raum vor, wo sich also die Verbreitungsgebiete der Geschwisterarten überschneiden (COLUZZI et al. 1965) (Abb. 2). *An. petragrani*-Populationen wurden vor allem in Gegenden gefunden, die westlich an das Mittelmeer grenzen. Dazu gehören die südlichen Provinzen von Frankreich und Korsika (COLUZZI et al. 1965, SCHAFFNER 1998), die südlichen Regionen Italiens inklusive Sardinien und Sizilien (COLUZZI et al. 1965, ROMI et al. 1997), Portugal (RAMOS et al. 1977/78; PIRES et al. 1982; RIBEIRO et al. 1988) und Spanien inklusive der Balearen (ENCINAS GRANDES 1982; ERITJA et al. 1998).

In der älteren Fachliteratur zur Biologie und Verbreitung von *An. claviger* wurde allerdings oftmals keine Unterscheidung zwischen *An. claviger* s.s. und *An. petragrani* vorgenommen. Daher sind die Angaben zur Verbreitung der beiden

Spezies kritisch zu betrachten, wobei insbesondere Unklarheit über das lokale Vorkommen im Mittelmeerraum herrscht. Auch die Vektorkompetenz für Malariaerreger muß in Frage gestellt werden. Während *An. claviger* s.s. in einigen Regionen Europas als Malariavektor angesehen wurde, wenn er endemisch vorkam, galt *An. petragani* als vektorinkompetent. (HARGREAVES 1923; MacDONALD 1957; KASAP 1986; JETTEN & TAKKEN 1994).

Da *An. claviger* s.s. als vorwiegend zoophil gilt (POSTIGLIONE et al. 1972), ist eine Übertragung von Malariaerregern auf den Menschen in ländlichen Gebieten, in denen ausreichend wilde und domestizierte Tiere als Blutwirte verfügbar sind, unwahrscheinlich. In urbanen Gebieten, in denen Knappheit an Tieren herrscht, muss er allerdings als potenzieller Vektor angesehen werden.

An. claviger s.l. spielt jedoch nicht nur als Überträger humanpathogener Malariaerreger eine Rolle, sondern er ist auch befähigt das Tahyna-Virus zu übertragen (PCHELKINA & SELEDTSOV 1978), und es wurde mindestens ein weiteres, nicht näher definiertes Virus der Bunyamwera-Gruppe der Bunyaviridae (TRAAVIK et al. 1985) sowie das Leporipox-Virus, der Erreger der Myxomatose, in ihm nachgewiesen (SERVICE 1971). Auch hier ist wiederum unklar, ob es sich jeweils um *An. claviger* s.s. oder um *An. petragani* handelte.

Zusammen mit anderen Mückenspezies steht *An. claviger* s.l. darüber hinaus unter dem Verdacht weitere mehr oder weniger wirbeltierpathogene Viren zu übertragen, deren Verbreitung nicht bekannt ist. So ist zum Beispiel auch sehr wenig über das Vorkommen und die Übertragung des West-Nil-Virus in Europa bekannt (HUBÁLEK & HALOUZKA 1999), das wahrscheinlich eine weitaus größere Verbreitung hat, als bisher angenommen. Zwar wird die Mehrheit der bisher diagnostizierten Fälle von West-Nil-Fieber auf infizierte Mücken der Gattung *Culex* zurückgeführt, jedoch wurde das Virus kürzlich auch in Mücken einer *Anopheles*-Art nachgewiesen (*An. quadrimaculatus*) (CDC 2002).

An. claviger s.l. wird außerdem verdächtigt, an der Übertragung des Bakteriums *Francisella tularensis* (ADAMOVICH & STRUTINSKIĬ 1974) auf den Menschen sowie des Protozoons *Anaplasma marginale* (ARTEMENKO & PONOMARENKO 1974) und der Filarie *Setaria labiatopapillosa* (CANCRINI et al. 1997) auf Rinder beteiligt zu sein.

Betrachtet man das sich häufende Vorkommen autochthoner Fälle von Krankheiten, die von vermeintlich tropischen Vektoren übertragen werden, z.B. der von

Phlebotomen übertragenen Leishmaniose, in Ländern mit gemäßigttem Klima, so wird verständlich, dass auch in Europa das Interesse an einer genauen und kontinuierlichen Kartographierung von möglichen Vektoren steigt.

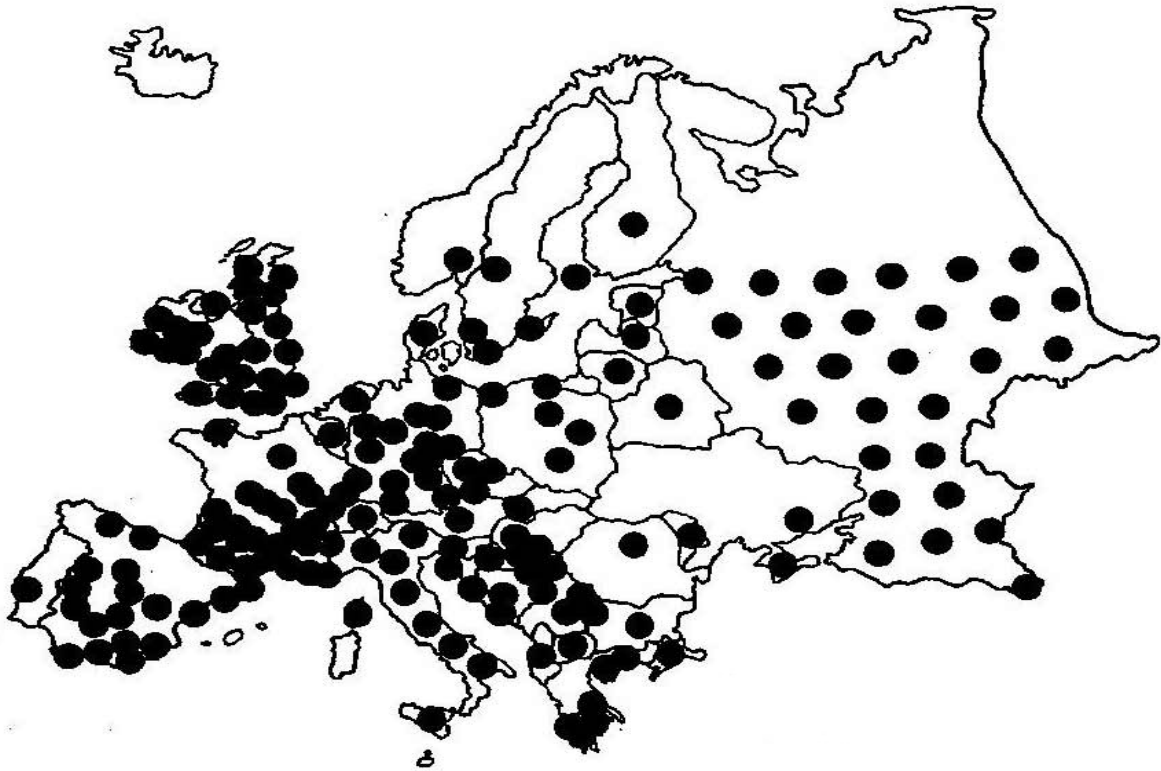


Abb. 1: Fundorte von *An. claviger* s.s innerhalb Europas (RAMSDALE & SNOW 2000)



Abb. 2: Fundorte von *An. petragrani* innerhalb Europas (RAMSDALE & SNOW 2000)

2.1.2 Identifizierung von Geschwisterarten

2.1.2.1 *Morphologische und ökologische Artdifferenzierung*

Die Differenzierung von Geschwisterarten innerhalb eines Artenkomplexes war in der Vergangenheit aufgrund fehlender morphologischer Unterschiede schwierig. Dies wiederum machte eine biologisch-taxonomische Einteilung sehr schwer (MAYR 1967). Bei genauerer Untersuchung wurde jedoch deutlich, dass auch Geschwisterarten häufig in bestimmten Entwicklungsstadien eine geringfügig abweichende Morphologie aufweisen. Innerhalb des *An. claviger*-Komplexes können die zwei Arten anhand von Unterschieden der Eihüllenstruktur (Abb. 3) und der Anordnung bestimmter Palmhaare der Larven- und Puppenstadien differenziert werden (Chätotaxonomie) (DEL VECCHIO 1939; LUPASCU 1941; PEUS 1942; SENEVET & ANDARELLI 1955; COLUZZI et al. 1965; MOHRIG 1969; MATHIEU & SCHAFFNER 2001).

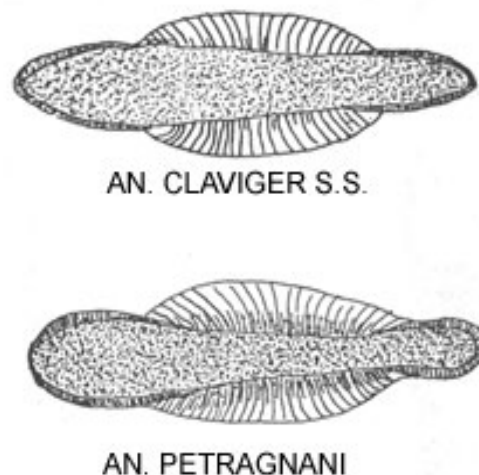


Abb. 3: Die Eihüllenstruktur der Geschwisterarten des *An. claviger*-Komplexes (SENEVET & ANDARELLI 1955)

Manche zur Unterscheidung der zwei kryptischen Arten herangezogenen Merkmale können nur vergleichend eingesetzt werden (MATHIEU & SCHAFFNER 2001). Der verlässlichste Unterschied bei den Larvenstadien ist daher die Anzahl der Äste des zweiten Antepalmarhaares des vierten Abdominalsegmentes. Bei *An. claviger* s.s. liegen drei bis fünf Äste gleicher Länge vor (Abb. 4a), bei *An. petragrani* zwei bis vier

Äste, von denen einer der mittleren Äste kürzer als die übrigen ist, wenn drei oder vier Äste auftreten (Abb. 4b). Bei den Puppenstadien ist ein deutlicher Unterschied an den Ästen des 0. Haares des sechsten Abdominalsegmentes zu erkennen: *An. claviger* s.s. besitzt drei bis fünf (Abb. 4c), *An. petragrani* ein bis zwei Äste (Abb. 4d).

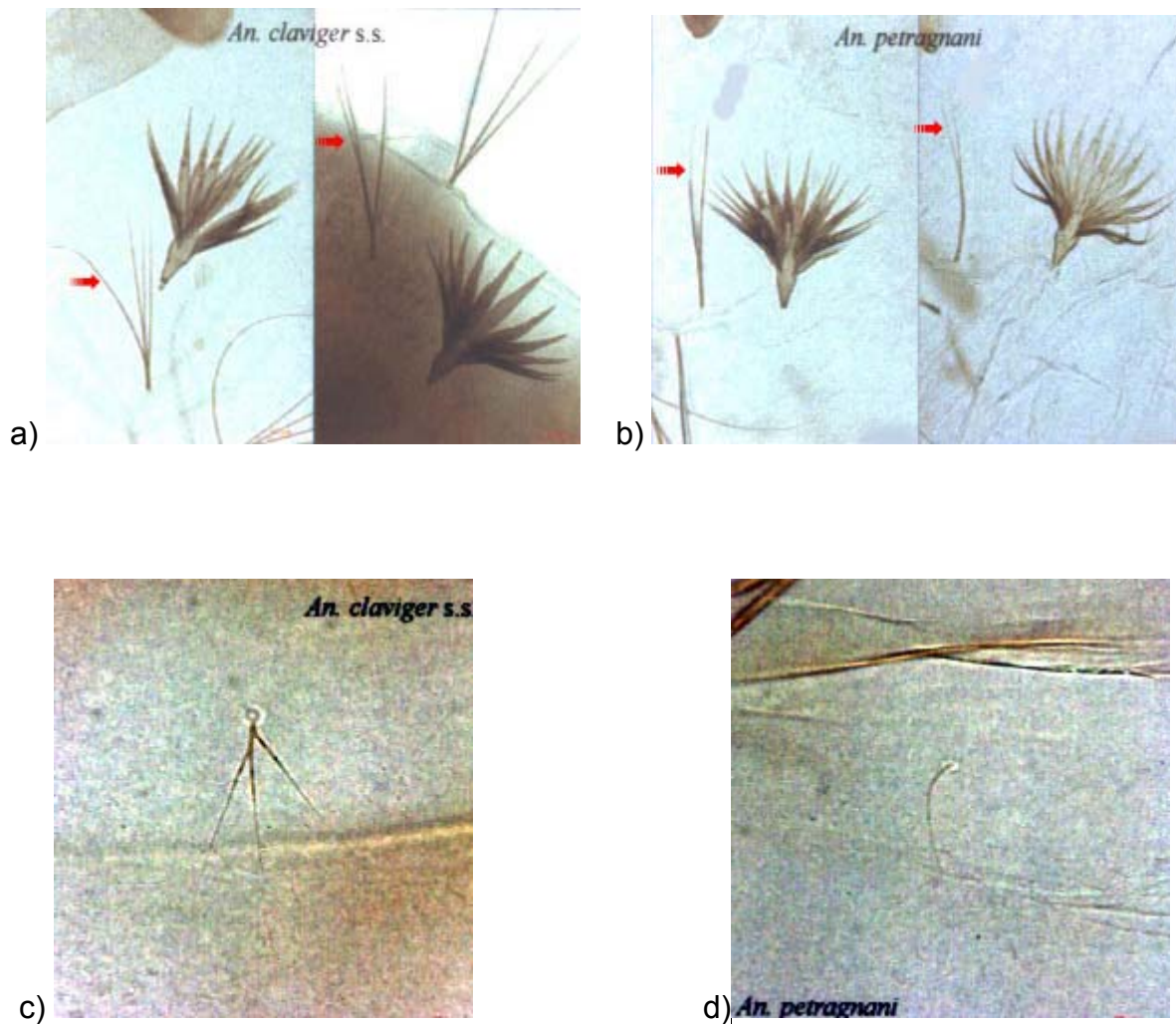


Abb. 4: a) 2. Antepalmarhaar des 4. Abdominalsegmentes der Larve von *An. claviger* s.s.
 b) 2. Antepalmarhaar des 4. Abdominalsegmentes der Larve von *An. petragrani*
 c) 0. Haar des 6. Abdominalsegmentes der Puppe von *An. claviger* s.s.
 d) 0. Haar des 6. Abdominalsegmentes der Puppe von *An. petragrani*
 (MATHIEU & SCHAFFNER 2001)

Von anderen *Anopheles*-Arten unterscheiden sich die Larven des *An. claviger*-Komplexes einheitlich durch die Anordnung der Klypeal- und Fronthaare am Kopf (Abb. 5). Die inneren Klypealhaare stehen dicht beieinander, die äußeren sind

entweder einfach oder zweimal geteilt. Die Frontalhaare sind gefächert. Die pigmentierten Stellen an der Basis der Frontalhaare sind punktförmig angeordnet.

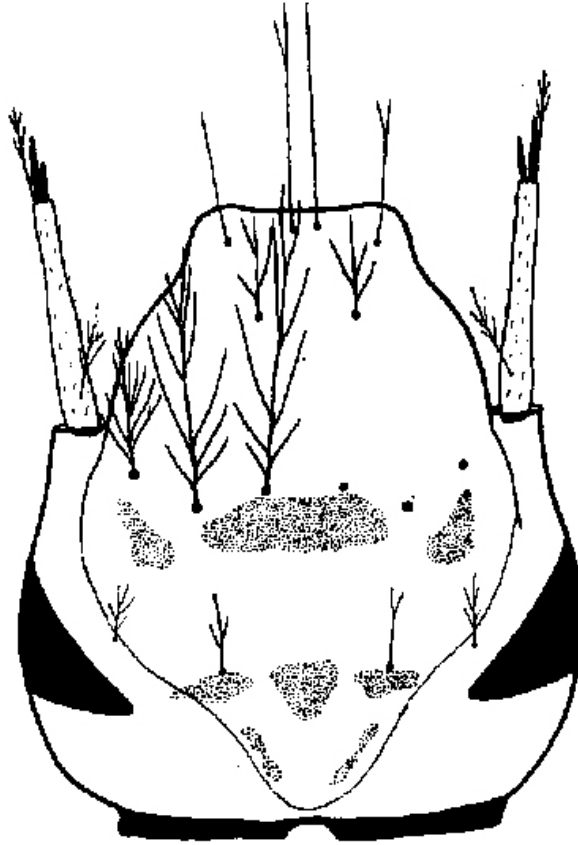


Abb. 5: Larve von *An. claviger* s.s.-
Kopf mit Klypeal- und Fronthaaren
(MOHRIG 1969)

Im adulten Stadium wird *An. claviger* s.l. mit durchgehend dunkel geschuppten Flügeln, einem weißen frontalen Schopfbüschel, einer farbigen Proboscis und einem breiten, weißen medianen Streifen auf dem Mesonotum beschrieben. Die Eier sind einheitlich dunkel.

Nach KÜHLHORN (1965) und POSTIGLIONE et al. (1973) bevorzugt *An. claviger* s.s. Brutgewässer mit einer Oberflächentemperatur von 12-20 °C. Wegen der weiten Verbreitung der Spezies ist die jeweilige Eignung eines Gewässers als Brutplatz von den regionalen Milieubedingungen abhängig. Im Norden Europas werden halbschattige Gewässer mit partieller Sonnenexposition vorgezogen, in der Türkei

eher schattige Quellen und Brunnen. Noch weiter südlich werden unterirdische Zisternen als bevorzugte Brutgewässer aufgesucht (KÜHLHORN 1965; POSTIGLIONE et al. 1972, 1973). *An. claviger* s.s. wurde sowohl in natürlichen und künstlichen Fließgewässern (Quellen, Wiesen- und Waldbächen, Entwässerungsgräben), als auch in stehenden Gewässern unterschiedlicher Größe (Uferbuchten von Seen, Teiche, Tümpel in Bombentrichtern, aufgelassene Kiesgruben, unbenutzte Regentonnen und z.T. Fußabdrücke größerer Wirbeltiere) gefunden (KÜHLHORN 1965; POSTIGLIONE et al. 1972; BASTIAN 2000).

Über die Eigenschaften der Brutplätze von *An. petragani* sind in der Fachliteratur keine detaillierten Angaben zu finden. Bei COLUZZI (1962) wird *An. petragani* lediglich als typisch mediterraner Moskito beschrieben, der auch höhere Wassertemperaturen toleriert.

2.1.2.2 Biochemische und cytotaxonomische Artdifferenzierung

Wegen der unzureichenden morphologischen Differenzierungsmerkmale bei Geschwisterarten entstand der Bedarf zur Entwicklung neuer, nicht morphologisch ausgerichteter Identifizierungsmethoden. Die verlässlichsten hiervon basieren auf den Charakteristika von Proteinen und Chromosomen.

Zwei Verfahren, die schon seit längerem für die Artdiagnostik eingesetzt werden, sind die Zymotaxonomie und die Cytotaxonomie. Bei der Zymotaxonomie (BULLINI & COLUZZI 1978; MILES 1978; KORVENKONTIO et al. 1979; STEGNII 1982; FOLEY & BRYAN 1993; SCHAFFNER et al. 2000) führt die unterschiedliche Mobilität von Isoenzymen in Gelen zu einem typischen Bandenmuster, das oft eine taxonomische Einteilung erlaubt (MAHON et al. 1976; NARANG et al. 1989). Nachteile dieser Methode sind zum einen die Tatsache, dass Enzyme in verschiedenen Entwicklungsstadien oder möglicherweise auch unter Beeinflussung von Biotopen unterschiedlich exprimiert werden und dass demnach jedes Stadium einen eigenen Bestimmungsschlüssel benötigt, und zum anderen, dass das Untersuchungsmaterial frisch oder in flüssigem Stickstoff gefroren vorliegen muss, da Proteine sehr schnell nach dem Tod des Organismus denaturieren. Die Cytotaxonomie bedient sich charakteristischer Bandenmuster polytärer Chromosomen (Riesenchromosomen), die durch eine spezielle Färbung dargestellt werden können. Sie wurde in der Anopheles-Forschung zunächst zur Differenzierung der Geschwisterarten des *An.*

maculipennis-Komplexes eingesetzt, später auch bei Untersuchungen des *An. gambiae*-Komplexes (FRIZZI 1947; COLUZZI 1966; COLUZZI & SABATINI 1968; COLUZZI et al. 1979; DUNBEAR & VAJIME 1981), und gehört auch heute noch zu den wichtigsten artdiagnostischen Methoden. Die Beurteilung der Bandenmuster benötigt jedoch sehr viel Übung und Erfahrung (FRIZZI 1947, 1953; FRENCH et al. 1962; COLUZZI 1968; HUNT 1973; WHITE et al. 1975), und die Methode kann nur bei bestimmten Entwicklungsstadien angewendet werden: zur Ausbildung von Riesenchromosomen kommt es nur in den Ovarien halbgravider, d.h. abdominal halb mit Blut und halb mit Eiern gefüllter, Mückenweibchen und in den Speicheldrüsen des vierten Larvenstadiums (FRIZZI 1953; KITZMILLER et al. 1967; STEGNII 1987).

2.1.2.3 Molekularbiologische Artdifferenzierung

Auf einer DNA-Analyse basierende Verfahren zur Identifizierung von Geschwisterarten haben entscheidende Vorteile: DNA kann aus allen Entwicklungsstadien der zu untersuchenden Spezies gewonnen werden. Das Material kann unterschiedlich konserviert sein, ohne dass die DNA zerstört wird. Es wird nur sehr wenig Gewebe der Insekten zur DNA-Gewinnung benötigt, was die Verwendung des übrigen Mückenmaterials oder sogar der noch lebenden Mücken für weitere Untersuchungen erlaubt (PASKEWITZ et al. 1993; KAMPEN et al. 1995).

Mit Hilfe der PCR kann DNA vor der weiteren Analyse zufällig (mit unspezifischen Primern) oder selektiv (mit spezifischen Primern) vervielfacht werden. Ein großer Vorteil der PCR liegt darin, dass es sich um eine sehr zeitsparende Methode handelt, mit der relativ viele Mückenexemplare pro Tag untersucht werden können (CORNEL et al. 1996).

Bei der RAPD (engl.: random amplified polymorphic DNA)-PCR-Analyse hybridisieren nur Primer, die wenige Nukleotide lang und daher weitgehend unspezifisch sind, mit zahlreichen, zuvor nicht bekannten Stellen der genomischen DNA. Dies führt zur Amplifikation von verschiedenen langen Fragmenten, die auf einem Gel eine artdiagnostische Bandenabfolge erzeugen können (SUCHARIT & KOMALAMISRA 1997). Wegen der Unspezifität der Primer kann allerdings jede Kontamination mit Fremd-DNA unerkannt zu falschen Ergebnissen führen. Des Weiteren führt diese Methode häufig zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen, wenn in

unterschiedlichen Laboratorien mit Geräten und Lösungen verschiedener Hersteller gearbeitet wird (BLACK 1993).

Mit spezifischen Primern amplifizierte DNA-Regionen werden dagegen für die PCR-RFLP (engl.: PCR-restriction fragment length polymorphism) benötigt. Die PCR-RFLP macht sich Sequenz-Unterschiede in einander entsprechenden DNA-Bereichen zu nutze, die sich in der Bildung, Eliminierung oder Verschiebung von Schnittstellen für Restriktionsenzyme niederschlagen. Bei dieser Methode wird die größenabhängige Wanderung von DNA-Fragmenten, die durch die Restriktionsspaltung mit bestimmten Enzymen entstanden sind, auf einem Agarose-Gel beobachtet. Auch hierbei entstehen spezifische Bandenmuster, die zur Differenzierung von Arten herangezogen werden können (BEEBE & SAUL 1995).

Eine weitere Methode zur Artidentifizierung bedient sich diverser DNA-Sonden, die aufgrund ihrer hohen Selektivität und Sensitivität in der Lage sind, Sequenzen und deren Aberration zu erkennen, selbst wenn ihre Konzentration nur ein Molekül je Zelle beträgt (ALBERTS et al. 1990). Die spezifische Hybridisierung der Sonden mit der DNA kann über radioaktive oder nichtradioaktive Markierungstechnologien sichtbar gemacht werden. DNA-Sonden zur Identifizierung von *Anopheles*-Geschwisterarten wurden z.B. von COLLINS et al. (1987) und GALE & CRAMPTON (1987) für den *An. gambiae* Komplex, von PANYIM et al. (1988) für den *An. dirus*-Komplex und von BOOTH et al. (1991) entwickelt.

Wegen ihrer Simplizität bedient man sich zur Differenzierung von Geschwisterarten aber mittlerweile i.d.R. einer direkten artdiagnostischen PCR, die für jede Spezies Amplifikate artcharakteristischer Länge liefert.

Aufgrund verschiedener Eigenschaften wird für phylogenetische und populationsgenetische Untersuchungen von Eukaryoten häufig die ribosomale DNA (rDNA) verwendet (FRITZ et al. 1994; PASKEWITZ & COLLINS 1997). OLSEN und WOESE bezeichneten 1993 die rDNA aufgrund ihrer Fähigkeit, Mutationen zu akkumulieren, als „genetische Uhr“. So manifestieren sich evolutive Veränderungen in einigen Zwischensequenzen der rDNA sehr schnell, andere Regionen dagegen sind hochkonserviert. Dies führt dazu, dass eng verwandte Spezies, die sonst kaum genetische Unterschiede aufweisen, differenziert werden können (FRITZ et al. 1994).

Die rDNA kodiert für die ribosomale RNA (rRNA), welche die drei Hauptelemente der Ribosomen bildet. Teile der rDNA sind hochkonserviert und finden sich von Bakterien bis zum Menschen in gleicher Form wieder. Abschnitte dieser konservierten Regionen, die die Zwischensequenzen flankieren und deren Sequenzen aus der molekularbiologischen Bearbeitung entfernter Verwandter bereits bekannt sind, können zur Konstruktion von Primern für die Amplifikation der noch unbekannten variablen DNA-Zwischensequenzen herangezogen werden (GERBI 1986, PORTER & COLLINS 1991). Diese können dann sequenziert und weiter analysiert werden.

Wie bei allen eukaryotischen Zellen ist die rDNA von Mücken aus sich wiederholenden Transkriptionseinheiten zusammengesetzt, die durch intergenische Zwischensequenzen (engl.: intergenic spacer, IGS) getrennt sind (BECKINGHAM 1982; Abb. 6). Innerhalb jeder Einheit befinden sich drei kodierende Regionen für die ribosomalen Untereinheiten 18S, 28S und 5,8S. Die etwas kleinere Transkriptionseinheit der 5,8S rDNA liegt zwischen den beiden inneren transkribierten Zwischensequenzen ITS1 und ITS2 (engl.: internal transcribed spacer). Eine weitere Zwischensequenz, die äußere transkribierte Zwischensequenz (engl.: external transcribed spacer, ETS), befindet sich zwischen der IGS-Region und der kodierenden Region für die ribosomale Untereinheit 18S. Hinsichtlich der inter- und intraspezifischen Sequenzpolymorphismen variieren die verschiedenen Regionen erheblich. Im Gegensatz zur IGS-Region, die eine große Anzahl von Polymorphismen aufweist, zeigen die kodierenden Untereinheiten 18S, 5,8S und 28S nur wenige Unterschiede zwischen Individuen, Arten und Geschwisterarten. Die beiden ITS-Regionen sind zwar kürzer als der IGS, zeigen aber ebenfalls eine große Variabilität. Da diese Polymorphismen selten intraspezifisch, hingegen häufig interspezifisch auftreten, sind die ITS-Regionen prädestiniert für die Artdiagnostik (BECKINGHAM 1982; WESSON et al. 1993; CRABTREE et al. 1995; CORNEL et al. 1996; PASKEWITZ & COLLINS 1997).

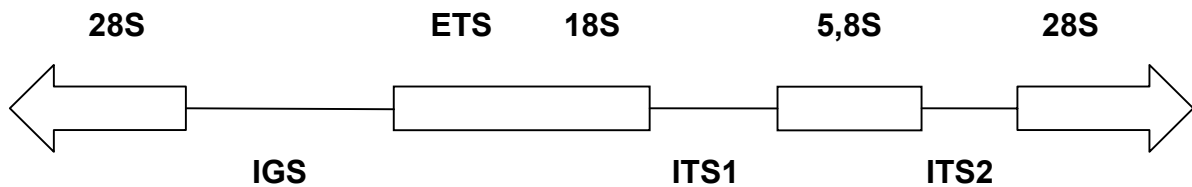


Abb. 6: Spezifische Gengruppe der rDNA
 28S, 18S, 5,8S = kodierende Untereinheiten
 IGS = intergenic spacer
 ETS = external transcribed spacer
 ITS1, ITS2 = internal transcribed spacer

Die artdiagnostische PCR, bei der bereits während der DNA-Amplifikation in Abhängigkeit von der jeweiligen DNA-Matrize unterschiedlich lange PCR-Produkte gebildet werden, ist eine sehr zuverlässige Technik zur Differenzierung von Geschwisterarten und wird aufgrund ihrer einfachen und schnellen Handhabung sehr häufig angewandt. Bei ihrer Entwicklung muss zunächst eine DNA-Region, von der bekannt ist, dass interspezifische Variationen auftreten, wie z.B. die ribosomale ITS2-Region, mit Hilfe von Universalprimern amplifiziert werden. Nach einer DNA-Sequenzierung führt ein Sequenzvergleich zwischen den Arten zur Erkennung von Unterschieden in der Nukleotidabfolge, die dann dazu verwendet werden, speziesspezifische Primer zu konstruieren. Diese müssen in einer diagnostischen PCR in Kombination mit einem der Universalprimer Amplifikate von artcharakteristischer Länge hervorbringen. Sequenzen von Universalprimern für die Vervielfältigung von Zwischensequenzen der rDNA von Anophelen sind bereits veröffentlicht und bedürfen daher keiner aufwendigen Vorarbeiten (PORTER & COLLINS 1991; PASKEWITZ et al. 1993; SCOTT et al. 1993; FRITZ et al. 1994).

2.2 Populationsgenetische Untersuchungen

2.2.1 Molekularbiologische Differenzierung von Populationen

Populationsgenetische Studien können Auskunft darüber geben, ob ein Genfluss zwischen verschiedenen Mücken-Populationen einer Art besteht oder ob sie vollkommen isoliert voneinander sind (COLLINS et al. 2000, FAIRLEY et al. 2000). Es wird davon ausgegangen, dass die Geschwisterarten eines Artenkomplexes Abkömmlinge von Populationen einer Art sind, die sich im Laufe der Zeit durch Mutationen von dieser isolierten. Natürlich unterliegen auch aktuell existierende

Populationen einer Spezies diesen evolutiven Mechanismen, und es ist davon auszugehen, dass der Genfluss auch zwischen ihnen kontinuierlich abnimmt und im Endeffekt zur Bildung isolierter Arten führen wird (TABACHNICK & BLACK 1995).

Hinweise auf den Genfluss zwischen Populationen oder den Isolationsgrad von Populationen lassen Rückschlüsse auf die Ausbreitung genetischer Eigenschaften zu. Ist der Genfluss zwischen zwei geografisch voneinander getrennten Populationen kontinuierlich (Panmixie), so impliziert dies, dass ein bestimmtes Gen, welches in der einen Population zu Tage tritt, im Laufe der Zeit auch auf die andere Population übergehen wird. Dabei kann es sich zum Beispiel um Gene handeln, die für die Insektizidresistenz oder die Vektorkompetenz einer Population verantwortlich sind. Deshalb sollten in effizienten Kontrollprogrammen von Vektoren populationsgenetische Studien integriert sein.

Ein Genfluss ist auf der anderen Seite Voraussetzung für das Konzept der Ausbringung transgener Moskitos, die ihre genetisch verankerten, Vektoruntauglichen Eigenschaften in benachbarte Populationen eintragen sollen. Mittels populationsgenetischer Untersuchungen wäre es möglich vorauszusagen, wie schnell und wie weit sich entsprechende Eigenschaften verbreiten können (COLLINS et al. 2000).

Für populationsgenetische Untersuchungen bedient man sich häufig der mitochondrialen DNA (mtDNA). Bei ihr handelt es sich um ein relativ kleines, aus 14 (z.B. bei den Nematoden) bis ca. 40 Kilobasen (*Placopecten magellanicus*) bestehendes ringförmiges Molekül, welches in fast jeder Zelle vorkommt (BEARD et al. 1993). Die mtDNA liegt haploid vor und wird maternal vererbt, d.h. sie unterliegt keiner Rekombination (AVISE et al. 1987; HARTL & CLARK 1997). In ihrer Sequenz zeigen sich schnell zahlreiche intraspezifische Polymorphismen, da sie ca. zehnmal schneller evolviert als die DNA des Zellkerns (AVISE et al. 1987; SINGER & BERG 1992). Ein weiterer Vorteil der mtDNA in Hinsicht auf populationsgenetische Untersuchungen ist, dass keine Introns, repetitive DNA, Pseudogene oder große Zwischensequenzen vorkommen. Die mtDNA besteht aus Genen für 13 Messenger-RNAs, zwei ribosomalen RNAs und 22 Transfer-RNAs. Zu diesen 37 Genen kommt bei Vertebraten und Echinodermen der sog. „D-Loop“ und bei Insekten die „AT-reiche Region“ hinzu. Diese sind jeweils etwa 0,8 Kilobasen lang und kontrollieren die Replikation der mtDNA und die RNA-Transkription (AVISE et al. 1987). Die

3. Material und Methoden

3.1 Etablierung einer artdiagnostischen PCR für die Geschwisterarten des *An. claviger*-Komplexes

3.1.1 Prinzip

Bei der Entwicklung eines artdiagnostischen PCR-Tests wird nach folgendem Schema vorgegangen:

Die DNA genetisch definierter Individuen wird extrahiert und in Lösung gebracht, um sie für Analyseverfahren nutzbar zu machen. Aus der genomischen DNA wird eine geeignete DNA-Region, in diesem Fall die ITS2-Region der ribosomalen DNA, mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert, das PCR-Produkt dann aufgereinigt und sequenziert. In den DNA-Sequenzen der zu identifizierenden Arten wird nach intraspezifisch konstanten, aber interspezifisch variablen Abschnitten gesucht, die zur Konstruktion von speziesspezifischen PCR-Primern herangezogen werden können. Mit Hilfe der PCR und entsprechender speziesspezifischer Primer sollen schließlich DNA-Fragmente artcharakteristischer Länge produziert werden.

3.1.2 Herkunft und Bestimmung der *Anopheles*-Mücken

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Larven, Puppen und Imagines von *An. claviger* s.l. wurden im Zeitraum von 1993 bis 2003 in Frankreich, Spanien, Schottland, England, Dänemark, Schweden, der Tschechischen Republik, Österreich, den Niederlanden, Deutschland und Israel gesammelt¹. Die Mücken aus den Niederlanden, Israel und Deutschland (Bonn und Umgebung) wurden anhand morphologischer Merkmale mit Hilfe der Bestimmungsschlüssel von PEUS (1942), WEYER (1942) und MOHRIG (1969) bis zur Komplex-Ebene vorbestimmt. Die anderen Individuen waren bereits mit Hilfe larvaler Chätotaxonomie bis zur Spezies bestimmt sowie anhand biochemischer Merkmale (Isoenzym-Polymorphismen)

¹ Ein Großteil der Mücken wurde freundlicherweise von Dr. F. Schaffner (EID Méditerranée, Montpellier, Frankreich), Rink Gene (AquaSense, Amsterdam, Holland) und Dr. Heather Schnur (Gesundheitsministerium, Jerusalem, Israel) zur Verfügung gestellt.

weiter charakterisiert worden (SCHAFFNER et al. 2000; MATHIEU & SCHAFFNER 2001). Die genaue Anzahl und Herkunft der Mücken ist aus Tabelle 1 ersichtlich.

Tab. 1: Herkunft der *An. claviger* s.l.-Individuen und morphologische Identifizierung

Land	Lokalität	morphologische Identifizierung	Anzahl Mücken
Frankreich	Aisne, Aube, Bas-Rhin, Corrèze, Côte d'Or, Doubs, Haute-Corse, Haute-Marne, Haut-Rhin, Haute-Savoie, Ille-et-Villaine, Indre, Loire, Loire-Atlantique, Maine-et-Loire, Meurthe-et-Moselle, Oise, Puy-de-Dôme, Saône-et-Loire	<i>An. claviger</i> s.s. ^a	203
	Gard, Haute-Corse, Hérault, Tarn, Var	<i>An. petragrani</i> ^a	94
	Tarn	<i>An. claviger</i> s.l. ^b	3
Spanien	Serrania	<i>An. petragrani</i> ^a	6
Schottland	Highland, Strathclyde	<i>An. claviger</i> s.s. ^a	10
England	North Humberland	<i>An. claviger</i> s.s. ^a	1
Holland	Zuidholland	<i>An. claviger</i> s.l. ^b	39
Dänemark	Himmerland	<i>An. claviger</i> s.s. ^a	6
Schweden	Öland	<i>An. claviger</i> s.s. ^a	3
Tschechische Republik	Böhmen	<i>An. claviger</i> s.s. ^a	5
Österreich	Salzburg	<i>An. claviger</i> s.s. ^a	48
Deutschland	Bonn	<i>An. claviger</i> s.l. ^b	129
	Schwarzwald, Mecklenburg	<i>An. claviger</i> s.s. ^a	31
Israel	Banias	<i>An. claviger</i> s.l. ^b	14

^a Individuen wurden morphologisch bis zur Spezies identifiziert

^b Individuen wurden morphologisch bis zur Komplex-Ebene vorbestimmt

3.1.3 DNA-Extraktion

Prinzip

Die Extraktion der Mücken-DNA erfolgte anhand zweier verschiedener Protokolle. Für Sequenzierungen wurde das Protokoll von COLLINS et al. (1987) verwendet, das geringfügig nach PROFT et al. (1999) modifiziert wurde. Hierbei wird die DNA durch Lyse der Insektenzellen freigesetzt und anschließend durch verschiedene Wasch- und Inkubationsschritte von Proteinen und anderen Zellbestandteilen gereinigt. Für die PCR-Identifizierung wurde zusätzlich ein Kurzprotokoll zur DNA-Extraktion nach GUY und STANEK (1991) eingesetzt. Hierbei wird das Mückengewebe lediglich homogenisiert und in einer Ammoniaklösung aufgekocht.

3.1.3.1 DNA-Extraktion nach COLLINS et al. (1987):

Geräte und Chemikalien

Geräte:

Mikromörser
Wasserbad
Tischzentrifuge (Heraeus, Sepatech, Biofuge 13R)
Vakuumzentrifuge

Chemikalien:

Homogenisierungspuffer:
1,6 ml 5 M NaCl
5,48g Saccharose
12 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0
10 ml 1M Tris, pH 9,0
5 ml SDS (10 %)
100 ml dH₂O
Proteinase K (20mg/ ml)
8M Kaliumacetatlösung
70 %iges Ethanol

100 %iges Ethanol
dH₂O

Durchführung:

Ein ca. 2mm langes Gewebestück der Mücken (Larve, Puppe, Imago) wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit vorgelegtem Homogenisierungspuffer (50 µl) gegeben (der Homogenisierungspuffer sollte vor Verwendung eine Stunde bei 65 °C inkubiert werden, um DNAsen zu zerstören). Das Mückengewebe wurde mit einem Mikromörser zermahlen bis eine homogene Suspension entstanden war. Mit weiteren 50 µl des Puffers wurde der Mikromörser abgespült, um noch anhaftende Gewebsreste in das Reaktionsgefäß einzubringen. Auf je 100 µl des Homogenisierungspuffers wurden 1 µl Proteinase K (20 mg/ml) gegeben, um freiwerdende Nukleasen inaktivieren zu können, indem das Homogenat für 30 min bei 65 °C im Wasserbad inkubiert wurde. Anschließend wurden 14 µl 4 °C kaltes, 8M Kaliumacetat zugegeben, so dass eine 1 molare Lösung entstand. Nach gutem Durchmischen wurden die Proben mindestens 30 min auf Eis gestellt, um Proteine auszufällen. Es folgte ein 15 minütiger Zentrifugationsschritt (13000 U/min), um die Fällungsprodukte zu sedimentieren. Der Überstand mit der Mücken-DNA wurde in neue 1,5 ml Eppendorf-Gefäße pipettiert und mit 200 µl eisgekühltem 100 %igem Ethanol versetzt. Die Ausfällung der DNA erfolgte über 24 Stunden bei –20 °C. Am nächsten Tag wurden die Proben zunächst für 20 min bei 4 °C zentrifugiert; danach konnte der Überstand abpipettiert werden. Anschließend wurde das DNA-Sediment zuerst mit 200 µl 70 %igem Ethanol, danach mit 200 µl 100 %igem Ethanol gewaschen, wobei jedes Mal 5 min zentrifugiert wurde. In einer Vakuum-zentrifuge wurde die DNA für ca. 10 min getrocknet, bevor sie mit 100 µl dH₂O resuspendiert wurde. Die DNA-Lösung konnte so bei –20 °C im Gefrierschrank aufbewahrt werden.

3.1.3.2 DNA- Extraktion nach GUY und STANEK (1991):

Geräte und Chemikalien

Geräte:

Mikromörser

Heizblock

Chemikalien:

25 %ige Ammoniaklösung, 1:20 in dH₂O verdünnt

dH₂O

Durchführung:

Eine 25 %ige Ammoniaklösung wurde 1:20 mit dH₂O verdünnt. 100 µl von dieser Gebrauchslösung wurden zusammen mit einem ca. 2mm langen Gewebestück der Larve, Puppe oder adulten Mücke in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und mit einem Mörser homogenisiert. Danach wurden die Reaktionsgefäße in geschlossenem Zustand 20 min bei 100 °C inkubiert. Um den Druck innerhalb der Reaktionsgefäße zu erniedrigen, wurden die Gefäße auf ca. 90 °C heruntergekühlt und dann bei geöffnetem Deckel wieder auf 100 °C erhitzt bis etwa 50 % der Lösung (inkl. des Ammoniaks) verdunstet waren. Das so hergestellte Homogenat repräsentierte die fertige DNA-Lösung und konnte bei –20 °C gelagert werden.

3.1.4 PCR

Prinzip

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase-chain-reaction, PCR) wurde Mitte der 80er Jahre entwickelt (SAIKI et al. 1985) und wird seitdem routinemäßig in biochemischen und molekularbiologischen Laboratorien angewandt. Sie ermöglicht die Amplifikation (Vermehrungsfaktor 10^6 - 10^{12}) eines spezifischen DNA-Abschnittes definierter Länge innerhalb sehr kurzer Zeit. Voraussetzung ist die Kenntnis kurzer Nukleinsäuresequenzen an den beiden Enden der zu amplifizierenden DNA-Region.

Ausgangskomponenten für die PCR sind grundsätzlich ein angepasster Reaktionspuffer, Magnesiumchlorid, die vier Desoxynukleotide dATP, dTTP, dCTP und dGTP, eine DNA-Polymerase, zwei einzelsträngige Oligonukleotide als Primer und die Ziel-DNA als Matrize. Das Prinzip der PCR umfasst drei Reaktionsschritte, die sich zyklisch wiederholen. Zunächst wird die doppelsträngige genomische DNA durch Erhitzen auf 90-98 °C in ihre beiden komplementären Einzelstränge denaturiert. Dann wird der Reaktionsansatz auf eine spezifische Temperatur abgekühlt, bei der die beiden Primer mit ihren komplementären Sequenzen hybridisieren können. Dabei müssen die Primer alternativ an die beiden Einzelstränge der DNA binden und die zu amplifizierende Sequenz flankieren. Die Extension des DNA-Abschnittes erfolgt nun mit Hilfe der DNA-Polymerase, welche die Primer als Startsignal erkennt und durch Anhängen von Nukleotiden mit dem DNA-Strang als Matrize den komplementären Strang in 5'→3'-Richtung synthetisiert. Bei der DNA-Polymerase wird heutzutage vorwiegend ein Enzym aus dem thermostabilen Bakterium *Thermus aquaticus* eingesetzt, das sein Temperaturoptimum bei 72 °C hat, aber auch kurze Zeit bei Temperaturen bis 98 °C stabil bleibt (SAIKI et al. 1988). Diese Stabilität hat zur Konsequenz, dass nicht mehr nach jedem Denaturierungsschritt neue Polymerase zu dem Reaktionsansatz gegeben werden muss, wie es zu Beginn der PCR nötig war, als noch mit einer Polymerase von *Escherichia coli* experimentiert wurde, die durch die hohen Denaturierungstemperaturen inaktiviert wurde.

Da die PCR eine sehr sensitive Methode ist und kleinste Mengen an DNA amplifiziert werden, muss außerordentlich sauber gearbeitet werden, um zu verhindern, dass durch Kontaminationen falsch positive Ergebnisse entstehen (KWOK & HIGUCHI 1989). Amplifikation und Herstellung des PCR-Ansatzes sollten deshalb räumlich getrennt durchgeführt werden.

Um eine exakte Verteilung der Reaktionskomponenten auf Parallelansätze zu erreichen, sollte zunächst ein gemeinsamer „Mastermix“ für alle Ansätze hergestellt werden, der vor Zugabe der DNA-Lösungen auf die entsprechenden Reaktionsgefäße verteilt wird. Dieses Vorgehen ist zudem material- und zeitsparend. Bei jedem PCR-Lauf müssen eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt werden, um Fehler, wie Kontaminationen und Inhibition der enzymatischen Aktivität, erkennen zu können.

3.1.4.1 *Amplifikation der ITS2-Region der rDNA*

Die ITS2-Region der ribosomalen DNA wird von den für die 5,8S und 28S rRNA-Untereinheiten kodierenden Genen flankiert. Da diese hochkonserviert sind und nur geringe inter- und intraspezifische Sequenz-Unterschiede aufweisen, eignen sie sich hervorragend zur Konstruktion von Primern, mit deren Hilfe die variable ITS2-Region amplifiziert werden kann (PORTER & COLLINS 1991; WESSON et al. 1992; PASKEWITZ & COLLINS 1997). So hybridisiert ein Plus-Strang- (forward) Primer an eine konservierte Sequenz innerhalb der 5,8S Region, während sich ein Minus-Strang- (reverse) Primer an eine komplementär konservierte Sequenz der 28S-Region anlagert.

5,8S (forward): 5'-TGT GAA CTG CAG GAC ACA TG-3'
 28S (reverse): 5'-ATG CTT AAA TTT AGG GGG TA-3'

Geräte und Chemikalien

Geräte:

Thermocycler (Trioblock; T3, Biometra)
 Tischzentrifuge


Chemikalien:

Das Reaktionsvolumen für die PCR zur Amplifikation der ITS2-Region betrug jeweils 50 µl. Ein Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

10x Puffer	100mM Tris-HCl, pH 8,3; 500mM KCl
MgCl ₂	1mM
dNTPs	je 200µM
5,8S	200nM
28S	200nM
Taq-DNA-Polymerase	2,5 Einheiten (Invitrogen 5U/ µl)
dH ₂ O	40,5 µl
DNA-Lösung	1-3 µl

Durchführung

Die PCR wurde in einem T3-Thermocycler (Biometra) nach folgendem Thermoprofil durchgeführt:

Initial-Denaturierung	94 °C	10 min		35 Zyklen
Denaturierung	94 °C	1 min		
Primer-Annealing	50 °C	1 min		
Extension	72 °C	2 min		
finale Elongation	72 °C	10 min		

Bei jeder PCR liefen je eine Positiv- und eine Negativkontrolle mit. Die Negativkontrolle bestand aus dem Reaktionsansatz mit Zugabe von dH₂O anstelle von DNA und die Positivkontrolle aus DNA von *An. maculipennis* s.s..

3.1.4.2 Agarose-GelelektrophoresePrinzip

Zur Überprüfung des PCR-Erfolges wird bei der Agarose-Gelelektrophorese die Eigenladung der DNA ausgenutzt, um die DNA im elektrischen Feld aufzutrennen. Die Ladungsträger sind hierbei die negativ geladenen Phosphatgruppen des Zucker-Phosphat-Gerüsts der Nukleinsäuren. Im elektrischen Feld wandert die DNA Richtung Anode. Bei dieser Wanderung der DNA spielt die Größe der DNA-Fragmente zunächst keine Rolle, denn Nukleinsäuren besitzen eine gleichbleibende Ladungsdichte, so dass das Verhältnis von Molekulargewicht zu Ladung stets konstant bleibt. So wäre die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld der einzelnen DNA-Fragmente in freier Lösung gleich groß. Wenn man aber als Trägermaterial des Gels Agarose wählt, werden die DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt, denn die Agarose besteht aus einem Netzwerk von Poren. Die DNA muss durch die Poren wandern, um im elektrischen Feld bis zur Anode zu gelangen. Das bedeutet, dass kleinere DNA-Fragmente schneller durch das Gel wandern können als größere Fragmente. Dadurch kann man eine Auftrennung der

DNA-Fragmente nach ihrer Größe erreichen. So werden kleinere Moleküle im Gel nach der Auftrennung als Banden in der Nähe der Anode zu sehen sein. Mit zunehmender Größe der DNA wird ihre Wanderungstrecke immer kürzer, d.h. die Banden immer weiter weg von der Anode (in Nähe der Kathode) auftreten.

Geräte und Chemikalien

Geräte:

- Elektrophoresekammer
- Spannungsquelle
- UV-Lampe
- Gel-Dokumentationssystem

Chemikalien:

- 10x TBE-Puffer
 - 108g Tris-HCl, pH 8,0
 - 55g Borsäure
 - 7,44g EDTA
 - dH₂O ad 1l
- 100 bp DNA-Größenmarker (Fa. peqLab)
- Ladepuffer (Bromphenolblau/Xylencyanol/Formamid)
- Agarose
- Färbelösung:
 - Ethidiumbromid-Stocklösung (10mg/ ml)
 - dH₂O

Durchführung

Die Agarose-Gelelektrophorese diente der Kontrolle des PCR-Erfolges. Die Auftrennung nach der Größe der DNA-Fragmente erfolgte in einem 1,5 %igen Agarosegel (1,5g Agarose + 98,5 ml 1x TBE-Puffer). Als Laufpuffer diente 0,5x TBE-Puffer. In die Geltaschen wurden 10 µl des PCR-Produktes, vermischt mit 2 µl Ladepuffer, gegeben. Um die Größe der DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde zusätzlich ein Längenstandard auf das Gel aufgetragen. Nach einer Laufzeit von ca. 1-1,5 h bei 80-120 V, wurde das Gel 10-20 min (je nach Alter der

Färbelösung) in einem Ethidiumbromidbad (0,5µg/ ml) gefärbt. Anschließend wurde es mit UV-Licht einer Wellenlänge von 312nm betrachtet, zur Dokumentation fotografiert und als Foto digital gespeichert.

3.1.5 Aufreinigung der PCR-Produkte

Zur Gewinnung sauberer PCR-Produkte für Sequenzierungszwecke wurden die Amplifikate aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und mittels des „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) nach Angabe des Herstellers eluiert. DNA einer Größe von mehr als 40 Basenpaaren bindet an die in der Aufreinigungssäule enthaltene Matrix, wohingegen kleinere DNA-Fragmente, Oligonukleotide, Nukleotide sowie Proteine etc. durch die Matrix passieren und abgetrennt werden. Diese Aufreinigung der PCR-Produkte wird durch weitere Waschschrte mit mitgelieferten Puffern unterstützt. In einem letzten Waschschrte mit dH₂O kann das PCR-Produkt aus der Matrix eluiert und in Form einer DNA-Lösung aufgefangen werden.

Von dem auf diese Weise gewonnenen, ca. 30 µl umfassenden Eluat wurden 4 µl auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen, um einerseits den Erfolg der Elution zu kontrollieren und andererseits eine Quantitätsabschätzung machen zu können. Zu letzterem Zwecke wurde parallel zum Eluat die SmartLadder SF (Eurogentec) als Längenstandard aufgetragen, deren Banden definierte Mengen von DNA enthalten. Mit ihrer Hilfe konnte die ungefähre Menge DNA, die in dem Eluat enthalten war, abgeschätzt werden. Für die Sequenzierung wurde ein Volumen des Eluats präpariert, welches einer Menge von 20-30ng pro 100 bp des zu sequenzierenden DNA-Fragmentes entsprach. Das Eluat wurde mittels Vakuumzentrifuge getrocknet. Pro Sequenzierungsansatz wurde 1 µl (10pmol/ µl) eines der beiden PCR-Primer als Sequenzierungsprimer mitgeschickt.

3.1.6 Sequenzierung der PCR-Produkte

Die DNA-Sequenzierung wurde bei einem Dienstleistungsunternehmen (MWG Biotech) in Auftrag gegeben. Hier erfolgte die Sequenzierung der PCR-Produkte über das so genannte ‚cycle sequencing‘, dem das Kettenabbruch- oder Didesoxynukleotidverfahren nach SANGER et al. (1977) zu Grunde liegt. Es wird eine relativ geringe Menge an Matrizen-DNA mit einem großen Überschuss an

Primer, 2'-Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) und 2',3'-Dideoxynukleotidtriphosphaten (ddNTPs) sowie einer thermostabilen DNA-Polymerase versetzt. Der Ansatz wird 20-30 Mal dem Zyklus der PCR mit den Schritten DNA-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und DNA-Extension unterworfen. Hierbei werden Einzelstränge unterschiedlicher Länge hergestellt, wobei die Unterbrechung der Kettenverlängerung durch den Einbau der ddNTPs erfolgt, denen die für die weitere Verlängerung benötigte 3'-Hydroxygruppe fehlt. Das 5'-Ende eines jeden Fragmentes wird vom Sequenzierprimer (der in diesem Fall identisch mit einem der beiden PCR-Primer ist), das 3'-Ende vom Dideoxynukleotid gebildet. Die ddNTPs sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, so dass je nach Abbruch-ddNTP eine bestimmte Färbung des Fragmentes auftritt. Die DNA-Fragmente werden in einem Polyacrylamidgel nach ihrer Größe aufgetrennt, die Fluoreszenzfarbstoffe mit einem Laser selektiv detektiert sowie die Basensequenz mittels Computer berechnet.

3.1.7 Auswertung der Sequenzdaten

Die von dem Sequenzierungsunternehmen gelieferten Elektropherogramme wurden mit Hilfe des Computer-Programms Chromas 1.62 (Technolysium Pty. Ltd.) kontrolliert und die Nukleotidabfolge gegebenenfalls korrigiert, indem der Kurvenausschlag mit dem zugehörigen Nukleotid abgeglichen wurde. Die DNA-Sequenzen verschiedener Mücken wurden in das Programm CLUSTAL W (Intelligenetics, CA, USA) eingegeben, um ein Alignment zu erstellen.

3.1.8 Konstruktion und Austestung artspezifischer Primer

Prinzip

Für die Herstellung von artspezifischen (reversen) Primern wurden unterschiedliche, in ihren Nukleotidsequenzen voneinander abweichende Abschnitte der ITS2-Region von *An. claviger* s.s. und *An. petragrani* herangezogen. In Kombination mit dem universellen 5,8S- (forward) Primer sollten PCR-Fragmente unterschiedlicher Länge entstehen. Voraussetzung für die Sequenzen, die als speziesspezifische Primer fungieren sollen, ist eine ungefähre Übereinstimmung in Länge und

Schmelztemperatur sowie der Ausschluss der Bildung von intramolekularen Sekundärstrukturen und Primerdimeren (CORNEL et al. 1996).


Die in dieser Arbeit verwendeten speziesspezifischen Primer waren bereits von PROFT (2001) vorgeschlagen worden, beruhten jedoch auf der Sequenzierung einer nicht angegebenen, aber unzureichenden Anzahl von Individuen (PROFT 2001; KAMPEN, persönl. Mitteilung), und waren niemals systematisch evaluiert worden. Aus diesem Grunde wurden die ITS2-Regionen weiterer Mücken des Artenkomplexes von unterschiedlicher geografischer Herkunft intra- und interspezifisch analysiert und die Primer an *An. claviger*-Mücken unterschiedlicher geographischer Herkunft getestet.

Weiterhin mussten die Primer auf ihre Spezifität hin untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die artdiagnostische PCR an Individuen zahlreicher weiterer *Anopheles*-Arten, die sympatrisch mit denen des *An. claviger*-Komplexes vorkommen können, sowie an Individuen mehrerer Spezies der Gattungen *Aedes*, *Ochlerotatus* und *Culex* eingesetzt: *An. maculipennis* s.s., *An. atroparvus*, *An. sacharovi*, *An. labranchiae*, *An. melanoon*, *An. messeae*, *An. subalpinus*, *An. beklemishevi*, *An. stephensi*, *An. plumbeus*, *An. hyrcanus*, *Aedes vexans*, *Ae. albopictus*, *Ochlerotatus detritus*, *Oc. caspius*, *Oc. geniculatus*, *Culex modestus*, *Cx. pipiens* und *Cx. impudicus*.

Durchführung

Der Reaktionsansatz für die artspezifische PCR gleicht dem der Amplifikation der ITS2-Region. Lediglich der 28S-Primer wurde in gleicher Konzentration durch jeweils einen der beiden speziesspezifischen Primer ersetzt.

Das Thermoprofil war folgendes:

Initial-Denaturierung	94 °C	3 min		35 Zyklen
Denaturierung	94 °C	1 min		
Primer-Annealing	50 °C	1 min		
Extension	72 °C	2 min		
finale Elongation	72 °C	10 min		

3.2 Untersuchung des Isolationsgrades von *An. claviger* s.s.-Populationen mittels PCR-SSCP

3.2.1 Prinzip

Populationsgenetische Untersuchungen erfordern die Betrachtung von vielen Individuen sowohl identischer als auch unterschiedlicher geografischer Herkunft. Zum molekularbiologischen Vergleich von Individuen wurde hier ein Screening-Verfahren verwendet, das in den letzten zehn Jahren von ORITA und Mitarbeitern (ORITA et al. 1989a, b) etabliert wurde und dem Prinzip einer Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) entspricht. Es basiert auf dem Nachweis kleinster Mutationen innerhalb einzelsträngiger DNA. Bei der SSCP (engl.: single strand conformation polymorphism analysis) zeigen sich solche Mutationen anhand einer Mobilitätsänderung einander entsprechender einzelsträngiger DNA-Stränge, welche auf einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt werden (ORITA et al. 1989b; DOCKHORN-DWORNICZAK 1991). Diese Mobilität hängt von der jeweiligen Größe und Tertiärstruktur des DNA-Fragmentes ab, welche wiederum durch die Sequenz und Ladung des Moleküls sowie durch die Ausbildung intramolekularer Wasserstoffbrücken bestimmt wird. Tritt also eine Mutation auf, verändert sich mit hoher Wahrscheinlichkeit auch die Konformation des Moleküls durch veränderte intramolekulare Basenpaarungen (HISS et al. 1994). Dies wird anhand des veränderten Laufverhaltens auf dem Polyacrylamidgel sichtbar gemacht: je größer der Widerstand im Gel, bedingt durch Größe, Ladung und Konformation des Fragmentes, desto langsamer erfolgt die Wanderung im Spannungsfeld. Dem heutigen Wissensstand nach ist es noch nicht möglich, den Grad der Mobilitätsänderung, der durch eine Mutation bewirkt wird, vorherzusagen. Es wurde jedoch gezeigt, dass eine einzelne Basensubstitution in einem mehrere hundert Nukleotide langen Fragment, aufgetragen auf einem Polyacrylamidgel, einen für dieses Fragment spezifischen Wanderschaftscharakter, d.h. eine bestimmte Laufgeschwindigkeit, aufweist (HAYASHI 1991). Die Sensitivität der SSCP liegt nach einer Studie von HAYASHI (1991) bei Fragmenten einer Länge zwischen 100 und 200 Basenpaaren bei 99 %. Bei Fragmenten von 300-350 bp Länge kann man nach derselben Studie davon ausgehen, dass mehr als 80 % der vorhandenen Mutationen entdeckt werden. Je länger die Fragmente sind, umso geringer wird die

Wahrscheinlichkeit der Detektion von Mutationen in wenigstens einem der Einzelstränge (HAYASHI & YANDELL 1993; SHEFFIELD et al. 1993; LIU & SOMMER 1994). Weiterhin ist bei relativ langen Fragmenten die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Replikationsfehlern, d. h. falsch eingebauter Nukleotide infolge von Fehlleistungen der Taq-Polymerase, erhöht. Da diese Fehler jedoch nur vereinzelt auftreten und zufällig über die komplette DNA-Sequenz verteilt sind, kann man davon ausgehen, dass sie niemals zur Entstehung einer eigenen Subpopulation führen würden (HAYASHI 1991). Um solche Replikationsfehler durch zu lange Matrizen-DNA zu reduzieren kommt eine Verkürzung der DNA mittels Restriktionsenzymen in Frage. Hierbei muss aber ebenso beachtet werden, dass sich eine zu hohe Komplexität des Bandenmusters nachteilig auf eine genaue Beurteilung auswirken kann (HAYASHI & YANDELL 1993). Ein Nachteil der SSCP ist, dass Amplifikate mit falsch eingebauten Nukleotiden, die durch Lesefehler der Taq-Polymerase während der DNA-Amplifikation neben den eigentlichen PCR-Produkten entstehen, als zusätzliche Banden auf dem Polyacrylamidgel erscheinen. Diese Fehlerbanden sind jedoch in aller Regel von weitaus geringerer Intensität als die relevanten Banden und somit als unerwünschte Banden gut erkennbar (HAYASHI 1991).

Der zuvor amplifizierte, doppelsträngige Genabschnitt wird bei der SSCP zunächst durch Hitze denaturiert und anschließend sofort stark abgekühlt. Durch das drastische Absenken der Temperatur unterbleibt die Rehybridisierung der zwei komplementären Stränge und es entstehen zwei Klassen von DNA: Zum einen renaturierte (engl.: renatured single strand, RSS) Einzelstrang-DNA, d.h. DNA mit Basenpaarungen innerhalb des DNA-Einzelstranges, zum anderen denaturierte Einzelstrang-DNA (engl.: denatured single strand, DSS), die keine sekundäre Basenpaarung eingegangen ist, sondern linear vorliegt. Bei der RSS sind die Laufeigenschaften im Gel auf Substitutionen zurückzuführen, bei der DSS dagegen hängen die Laufeigenschaften allein von der Länge des Fragmentes, die durch Deletionen und Insertionen verändert sein kann, ab (PROFT 2001). Weiterhin entsteht renaturierte Doppelstrang-DNA, deren Mobilität auf einem Polyacrylamidgel zwischen der der DSS und der RSS liegt, die jedoch selten auch wirklich auf einem Gel zu erkennen ist (HISS et al. 1994).

Temperatur des Laufpuffers, Laufzeit, Stromstärke und Spannung müssen bei jeder PAGE unbedingt konstant und bei den verschiedenen Ansätzen immer bei gleichen

Werten gehalten werden, da es sonst zu starken Schwankungen kommen kann, so dass die Ergebnisse dann nicht mehr vergleichbar sind (HAYASHI 1991; HISS et al. 1994). Die aufgetrennten Amplifikate werden mit einer Silberfärbung sichtbar gemacht (siehe Kap. 3.2.5.3).

3.2.2 Herkunft der *Anopheles*-Mücken

In die populationsgenetischen Untersuchungen, die sich mit der mitochondrialen DNA beschäftigten, wurden insgesamt 47 Populationen mit 365 Mücken der Spezies *An. claviger* s.s. einbezogen. Von fünf Populationen (Charollais (Ch), Millevaches (Mv) - beide aus Frankreich -, Schwarzwald (Sw), Bonn (BN) und Holland (H)) standen so viele Individuen zur Verfügung, dass zwischen n=25 und n=34 Exemplaren untersucht werden konnten. Von den Populationen aus Frankreich, Spanien, Schottland, England, Dänemark, Schweden, der Tschechischen Republik und Österreich wurden jeweils fünf Individuen untersucht, von einer israelischen Population 14 (Tabelle 2). Es handelte sich um Larven, Puppen und Imagines. Die Mücken lagen entweder getrocknet oder fixiert in 96 %igem Ethanol vor.

Tab. 2: Anzahl, Herkunft und Bezeichnung der Populationen, der für die PCR-SSCP der ND4-Region verwendeten Mücken

Individuen	Herkunft	Bezeichnung
37	Freiland, Millevaches (F)	Mv1-16, 733/1-21
40	Freiland, Charollais (F)	Ch1-27, 886/1-13
25	Freiland, Schwarzwald (D)	Sw1-20, 1661/1-4
40	Freiland, Salzburg (AU)	Sb1-34 1669/1-6
25	Freiland, Bonn (D)	BN1-25
39	Freiland, Zuidholland (H)	H1-39
2	Freiland, Ullapool (SC)	1656
2	Freiland, Fort William (SC)	1657
1	Freiland, Hadrians Wall (SC)	1658
9	Freiland, Marie Louise (F)	206
2	Freiland, Mollau (F)	245
1	Freiland, Mont Blanc (F)	RA/97/3
5	Freiland, Öland (S)	957
5	Freiland, Thiérache (F)	1376
11	Freiland, Orient (F)	1372,1375
6	Freiland, Auxois (F)	1168-1171,1183,1184
5	Freiland, Brenne (F)	558,563,741,772,810
6	Freiland, Loire (F)	522-524,529-531
12	Freiland, Erdre (F)	816,817,835,837-839,841,843,844
12	Freiland, Layon (F)	710-714,716-719
1	Freiland, Bassigny (F)	1071
6	Freiland, Boucq (F)	414
8	Freiland, Allier (F)	472,594,661,664,701,702
8	Freiland, Niederlauterbach (F)	743-745,929,934-937
7	Freiland, Bresse (F)	1106,1084
5	Freiland, Bohemia (CZ)	1036
6	Freiland, Mecklenburg (D)	956
6	Freiland, Himmerland (DK)	958
5	Freiland, Rogliano (F)	1559
14	Zucht, Israel	Is
4	Freiland, MontStMichel (F)	1654
10	Freiland, Oise (F)	1655

Für die Etablierung der SSCP für die CO1-Region wurden 34 Individuen aus der Population Salzburg, 27 aus der Population Charolais und 14 aus der Bonner Population verwendet. Diese waren jeweils in 96 %igem Ethanol gelagert worden.

3.2.3 Amplifikation der auf Punktmutationen zu untersuchenden DNA-Abschnitte

3.2.3.1 *Amplifikation der ND4-Region der mitochondrialen DNA von An. claviger s.s.*

Die ND4 (Natriumdehydrogenase, Untereinheit 4) -Region ist ein Abschnitt der mitochondrialen DNA, die in fast jeder Zelle des tierischen Körpers vorkommt. Sie liegt haploid vor, wird maternal vererbt und unterliegt keiner Rekombination, weshalb sie zum Erkennen und Bewerten von Polymorphismen innerhalb von Populationen gut geeignet ist (AVISE 1986; HARTL & CLARK 1997).

Die unten aufgeführten Primer zur Amplifikation der ND4-Region gehen auf eine persönliche Mitteilung von Dr. C.H. PORTER (CDC, Atlanta, Georgia, USA) zurück:


ND4ar: 5'-AAA GGC TCA TGT TGA AGC-3'

ND4c : 5'-ATT TAA AGG TCA ATC AAT GTA A-3'

Ein Reaktionsansatz hatte ein Volumen von 50 µl und setzte sich zusammen aus:

10xPuffer	100mM Tris-HCl, pH 8,3; 500mM KCl
MgCl ₂	3mM
dNTPs	je 200µM
ND4ar	200nM
ND4c	200nM
Taq-DNA-Polymerase	2,5 Einheiten (5U/ µl)
DNA-Lösung	1 µl
dH ₂ O	ad 50 µl

Das Thermoprofil lief nach folgendem Schema ab:

Initial-Denaturierung	94 °C	4 min		35 Zyklen
Denaturierung	94 °C	1 min		
Primer-Annealing	52 °C	30 sec		
Extension	72 °C	2 min		
finale Elongation	72 °C	10 min		

3.2.3.2 *Amplifikation der CO1-Region der mitochondrialen DNA von An. claviger s.s.*

Die CO1-Region ist ein weiterer Genabschnitt der mitochondrialen DNA, der in populationsgenetischen Studien Verwendung fand (BOWLES et al. 1992; FOURNIER et al. 1994; NAVAJAS et al. 1994, 1998; SALLUM et al. 2002).

Zur Amplifikation eines Abschnittes dieser Region wurden die Primer 772 und 773 eingesetzt, die in Untersuchungen an Milben zum Einsatz gekommen waren (NAVAJAS et al. 1994) und in Vorversuchen auch mit Culiciden-DNA saubere PCR-Produkte erzeugt hatten (persönl. Mitteilung KAMPEN). Ihre Basensequenzen lauten wie folgt:


772: 5'-TGA TTT TTT GGT CAC CCA GAA G-3'

773: 5'-TAC AGC TCC TAT AGA TAA AAC-3'

Ein PCR-Ansatz enthielt 50 µl und setzte sich zusammen aus:

10x Puffer	100mM Tris-HCl, pH 8,3; 500mM KCl
MgCl ₂	3mM
dNTPs	je 200µM
772	400nM
773	400nM
Taq-DNA-Polymerase	2,5 Einheiten (5U/ µl)
dH ₂ O	39 µl
DNA-Lösung	1 µl

Das Thermoprofil für die Amplifikation der CO1-Region sah wie folgt aus:

Initial-Denaturierung	95 °C	4 min		46 Zyklen
Denaturierung	92 °C	1 min		
Primer-Annealing	50 °C	1 min		
Extension	72 °C	1 min		

Bei jeder PCR liefen je eine Positiv- und eine Negativkontrolle mit. Wie bereits zuvor wurde der Negativkontrolle Wasser anstelle von DNA zugegeben. Die Positivkontrolle hingegen bestand aus einem Reaktionsansatz mit Mücken-DNA, die bereits in vorangegangenen Versuchen erfolgreich amplifiziert worden war.

3.2.4 Restriktionsenzymatischer Abbau der ND4- und der CO1-Region

Prinzip

Restriktionsenzyme sind aus verschiedenen Bakterienarten isolierte Endonukleasen, die kurze Nukleotidsignalsequenzen erkennen und dort spezifisch schneiden. Sie hydrolysieren die Phosphodiesterbindung zwischen spezifischen Basen beider DNA-Stränge. So entstehen Fragmente, deren Längen von der Schnittposition des jeweiligen Enzyms abhängen (SINGER & BERG 1992).

Da für einen sicheren Nachweis von Mutationen mit Hilfe der PCR-SSCP DNA-Fragmente einer Länge von maximal 300 bp notwendig sind, die ND4-Region jedoch der gelelektrophoretischen Analyse zufolge PCR-Produkte einer Länge von etwa 700 bp und die CO1-Region PCR-Produkte einer Länge von etwa 480 bp aufwies, sollten die Amplifikate mittels Restriktionsenzymen in Bruchstücke von jeweils weniger als 300 bp Länge geschnitten werden. Die Suche nach geeigneten Enzymen wurde mit Hilfe des Computerprogramms Webcutter 2.0 durchgeführt (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2/ht ml>).

Geräte und Chemikalien

Geräte:

Thermocycler (s.o.)

Chemikalien:

Restriktionsenzyme *DraI*, *ApoI* (Gibco, New England Biolabs)

Enzym-Puffer (Gibco, New England Biolabs)

bovines Serumalbumin (BSA)

dH₂O

3.2.4.1 Restriktionsspaltung der ND4-Region

Die amplifizierte ND4-Region wurde mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *DraI* in kürzere Fragmente geschnitten. Die Erkennungssequenz, an der *DraI* die doppelsträngige DNA spezifisch schneidet, lautet 5'-AAA/TTT-3'.

Der pro Mücke hergestellte Restriktionsansatz bestand aus jeweils 0,5 µl (10 Einheiten) Restriktionsenzym, 2 µl Restriktionspuffer, 7,5 µl dH₂O und 10 µl PCR-Produkt. Der Ansatz wurde 3,5 Stunden bei 37 °C im Thermocycler inkubiert.

3.2.4.2 Restriktionsspaltung der CO1-Region

Für die Fragmentierung der CO1-Region wurde das Restriktionsenzym *ApoI* gewählt. Es erkennt und spaltet die Sequenz 5'-R/AATTY-3', wobei R für A oder G steht, und Y für C oder T. Der Reaktionsansatz bestand aus 0,5 µl Enzym, 0,2 µl BSA, 2 µl Restriktionspuffer, 7,3 µl dH₂O und 10 µl PCR-Produkt. Die Inkubationszeit betrug 3,5 Stunden bei 37 °C.

Um den Erfolg der Restriktionsspaltung zu kontrollieren, wurden jeweils 4 µl der Proben anschließend auf ein 2 %iges Agarose-Gel geladen. Bei sauberer Bandenbildung wurden die Restriktionsprodukte für die SSCP weiterverwendet.

3.2.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Geräte und Chemikalien

Geräte:

vertikale Elektrophoreseeinheit

Thermocycler (s.o.)

Tischzentrifuge

Trocknungsrahmen

Chemikalien:

MDE (Mutation Detection Enhancement)-Gellösung (Biozym)

Ladepuffer (Bromphenolblau/Xylencyanol/Formamid)

10x TBE-Puffer (Zusammensetzung s.o.)

TEMED

APS

Acrylease (Stratagene)

SDS/EDTA:

100 µl 10 % SDS

20 µl 0,5 M EDTA, pH 7

880 µl dH₂O

Elektrophorese

Für die PAGE wurden Gele im DIN A5-Format verwendet. Eine der beiden Glasplatten der Elektrophoreseeinrichtung wurde zuvor mit Acrylease besprüht, um später ein leichteres Ablösen vom Gel zu gewährleisten. Zur Herstellung eines Gels (Dicke 0,8mm) wurden zunächst 20,7 ml dH₂O, welches mindestens einen Tag ruhig gestanden hatte und somit frei von Luftblasen war, zu 7,5 ml MDE-Gellösung gegeben. Nach weiterer Zugabe von 1,8 ml TBE-Puffer wurden 165 µl APS als Polymerisationsstarter und 18,75 µl TEMED als Radikalfänger hinzugefügt, bevor das MDE-Gel gegossen wurde. Da der Hersteller der MDE-Lösung für die darin

enthaltene Acrylamid-Konzentration nur eine ungenaue Angabe von 30-40 % macht, ergibt sich für ein Polyacrylamidgel somit eine Konzentration von ca. 7,5-10 %.

Bis zur vollständigen Polymerisation des Gels dauerte es ca. 2 h. Danach konnte das Gel entweder direkt verwendet oder, in Cellophanfolie eingepackt, auch bis zu 12 h bei 4 °C aufbewahrt werden.

Zur Herstellung der einzelsträngigen Amplifikate wurden 10 µl der restringierten PCR-Produkte zunächst mit 3 µl SDS-EDTA und 3 µl Ladepuffer versetzt und dann 15 min bei 96 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proben für mindestens 10 min in Eiswasser gestellt, bevor der gesamte Reaktionsansatz auf das MDE-Gel aufgetragen wurde.

3.2.5.1 PAGE der ND4-Region

Da die ND4-Region bereits als Marker für populationsgenetische Studien mittels PCR-SSCP erprobt war (PROFT 2001), konnte für diese Arbeit auf fertige PAGE-Protokolle zurückgegriffen werden: Das Gel wurde 4 h bei einer Raumtemperatur von 4 °C und einer Stromstärke von 12 mA laufen gelassen.

3.2.5.2 PAGE der CO1-Region

Zwar war auch die CO1-Region schon für populationsgenetische Untersuchungen herangezogen worden (s.o.), so dass PCR-Protokolle vorlagen, jedoch waren die Amplifikate niemals per SSCP analysiert worden. Demzufolge war es hier erforderlich, ein PAGE-Protokoll empirisch zu ermitteln.

Die Gelelektrophorese wurde entsprechend der unter 3.2.5 gemachten Angaben vorbereitet und durchgeführt. Ausgegangen wurde ebenfalls von einer Laufzeit von 4 h bei 12 mA Stromstärke und einer Raumtemperatur von 4 °C.

3.2.5.3 Silberfärbung

Zur Visualisierung der entstandenen Bandenmuster wurde eine Silberfärbung, entsprechend der Anleitung von BUDOWLE et al. (1991), vorgenommen.

Chemikalien

1 %ige Salpetersäure

15,4 ml 65 %ige Salpetersäure
dH₂O ad 1l

10 %ige Essigsäure

100 ml Eisessig
dH₂O ad 1l

0,2 %ige Silbernitratlösung

2 g Silbernitrat
dH₂O ad 1l

0,28 M NaCO₃/Formaldehyd

29,7 g NaCO₃
ad 1 l dH₂O
0,5 ml 27 %ige Formaldehydlösung

Färbung

Für den Färbevorgang wurde das jeweilige MDE-Gel zunächst von der mit Acrylease behandelten Glasplatte entfernt. Die zweite Glasplatte diente als Unterlage, um das flexible Gel in die verschiedenen Färbelösungen geben zu können.

Als erstes wurde das Elektrophoresegel 12 min in der Salpetersäure fixiert. Um Reste der Fixierlösung zu entfernen, wurde das Gel danach in A. dest. gewaschen. Die Färbung erfolgte für 22 min in einem Silbernitratbad. Es schloss sich ein erneuter Waschschrift für 5-10 min mit A. dest. an. In frisch angesetzter Natriumcarbonat-Formaldehydlösung entwickelte sich die Färbung in ca. 20 min, so dass Banden auf dem Gel gut erkennbar waren. Sobald der Hintergrund begann, sich relativ zu den Banden stärker anzufärben, wurde das Gel sofort mit A. dest. gewaschen und für 5 min in Essigsäure fixiert. Anschließend wurde es ein letztes Mal in A. dest.

gewaschen. Nachdem es gut abgetropft war, wurde das Polyacrylamidgel 30 min in einer Glycerin-Ethanollösung entwässert, um es danach zur Konservierung in einen Trocknungsrahmen zwischen zwei Cellophanfolien zu spannen. Dies sollte möglichst ohne Luftblasenbildung geschehen, damit eine langandauernde Fixierung gewährleistet werden konnte. Nach etwa drei Tagen konnte das getrocknete Gel aus dem Rahmen genommen werden. Die Chemikalien für die Silberfärbung konnten bis zu dreimal wieder verwendet werden, ohne dass sich ein Sensitivitätsverlust zeigte.

3.2.6 SSCP-Analyse

Die Polyacrylamidgele wurden visuell auf Unterschiede zwischen den Bandenmustern untersucht. Bei Abweichungen wurden diese Individuen einer erneuten PCR mit anschließender PAGE unterzogen. Außerdem wurden die abweichenden Haplotypen auf ein gemeinsames Polyacrylamidgel aufgetragen, um einen besseren optischen Vergleich der Banden vornehmen zu können. Jede Abweichung des Bandenmusters wurde als Indiz für eine Mutation bewertet (PROFT 2001).

Die Charakterisierung der Mutationen erfolgte über eine DNA-Sequenzierung.

4. Ergebnisse

4.1 Etablierung und Evaluierung einer artspezifischen PCR für die Geschwisterarten des *An. claviger*-Komplexes

4.1.1 ITS2-Region der *An. claviger*-Geschwisterarten

Zur Erweiterung und Vervollständigung bereits vorliegender Sequenzierungsergebnisse wurde die ITS2-Region von je einem Individuum der Spezies *An. claviger* s.s. aus den fünf Populationen Charollais (Ch), Millevaches (Mv) - beide aus Frankreich -, Schwarzwald (Sw), Bonn (BN) und Holland (H) sowie je einem Individuum der Spezies *An. petragrani* aus den Populationen Argens, Callas, Montpellier, Albigeois und Porto Vecchio (alle aus Frankreich) und einem Individuum aus der Population Serrania aus Spanien amplifiziert und sequenziert.

Die ermittelten Nukleotidsequenzen der beiden Geschwisterarten waren intraspezifisch konstant, so dass Konsensus-Sequenzen gebildet werden konnten (Abb. 8).

Schon in der Länge der amplifizierten DNA-Fragmente trat ein Unterschied zwischen den beiden Geschwisterarten auf: *An. claviger* s.s. wies eine Fragmentlänge von 475 bp, *An. petragrani* von 436 bp auf. Die ITS2-Regionen, die in den Amplifikaten enthalten waren, waren 341 bp (*An. claviger* s.s.) bzw. 302 bp (*An. petragrani*) lang. Der GC-Gehalt der ITS2-Region von *An. claviger* s.s. betrug 56,3 %, der von *An. petragrani* 64,9 %. Im direkten Vergleich von Substitutionen, Insertionen und Deletionen der beiden Arten zeigten die ITS2-Regionen 21 % Unterschiede, wobei ca. 9 % auf Insertionen und Deletionen zurückzuführen waren.

		5.8S					
AP	1	TGTGAAGTGC	AGGACACATG	AACACCGACA	AGTTGAACGC	ATATTGCGCA	TCGTGCGACC
AC	1	TGTGAAGTGC	AGGACACATG	AACACCGACA	AGTTGAACGC	ATATTGCGCA	TCGTGCGACC
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
		→ITS2					
AP	61	AGCACGGTGT	ACACATTTTT	GAGTGCCTAT	ATTTATCCTT	CATTGCACTG	CGCGGTGACA
AC	61	AGCACGGTGT	ACACATTTTT	GAGTGCCTAT	ATTTATCCTT	CATTCAACTG	CGCGCTGCGT
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
AP	121	CCCG-TCTCG	GAA-CGACGC	GGCACCGACG	CGACCACTGA	TGCGTTGTGC	GACCGCCCGC
AC	121	GCCGGTCTAA	CAAACCGCGC	GACAGCGT-G	CGCCCACTGA	TGCGTTGTGC	AACCGCCCGC
		*** **	** *	***	* ** *	** *****	*****
AP	179	CGCGGAAGCG	CAAACATTGA	ATACCGAAGC	GTGTCGACCG	GCCAC-----	-----GTGCG
AC	180	CGCGGTAGCG	CAAACATTGA	ATACCGAAGC	GTGTTTTCCG	GCCACATAAC	GAGATGTGCT
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
AP	229	TG-CAACCAC	ACACAACAGG	CGCACTCGCT	AGCGTGCCCC	GGACCAACAC	CTCACCACG
AC	240	TGTCTTCCAA	<u>GGACA-CAGT</u>	<u>-GCACTTGCT</u>	<u>AGCGTGCCCC</u>	GGGCAACAC	CTCACCACG
		** *	*** **	*****	*****	** *****	*****
AP	288	TTAGCGCGTT	CGCGTGTGCG	TGTGCTCGGC	CCGAAGTGCC	GCCGCGAAGT	GCCGCCGTGC
AC	298	TTAGCGCGTT	CGCGTGTGCG	TGTGCTCGGC	CCGAAGTGCC	GCCGCGAGGT	GCTGTTTTGG
		*****	*****	*****	*****	*****	*****
AP	348	CGTGGCCACC	<u>AAAGTGTT--</u>	<u>-----G</u>	<u>CGCGCAACCG</u>	<u>G-----GAT</u>	<u>CT----ACAC</u>
AC	358	ATAATACACG	CAAGTACAAA	TAAACTCGGG	TGTGTAACCA	GATAAACGCT	TTCACGACAC
		***	****	*	* * * *	*	* * *
		ITS2-					
		28S					
AP	387	-----AA	CCACAGTAGG	CCTCAAATAA	TGTGTGGGTA	CCCCCTATAT	TTAAGCAT
AC	418	GAAGAAAAAA	CCTCAGTAGG	CCTCAAATAA	TGTGTGGGTA	CCCCCTAAAT	TTAAGCAT
		**	** *****	*****	*****	*****	*****

Abb. 8: Vergleich der ITS2-Sequenzen von *An. claviger* s.s. (AC) und *An. petragrani* (AP)
 * = Übereinstimmung
 unterstrichen = artspezifische Primer
 grau unterlegt = Universalprimer

4.1.2 Konstruktion von artspezifischen Primern für den *An. claviger*-Komplex

Unterschiede in der ITS2-Region der beiden Arten wurden dazu verwendet, speziesspezifische Primer herzustellen, die in Kombination mit dem komplexspezifischen Universalprimer 5,8S (UN) einen DNA-Abschnitt von speziesspezifischer Länge amplifizieren sollten.


Die aufgrund von Sequenzunterschieden zwischen den ITS2-Regionen der beiden Geschwisterarten konstruierten Primer sind in Tab. 3 dargestellt, ihre genaue Lage ist in Abb. 8 ersichtlich gemacht. Der Vollständigkeit halber ist auch der komplexspezifische Primer aufgeführt.

Tab. 3: Charakteristika der Primer der artspezifischen PCR

Primer	Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'→3')	Schmelz- temperatur [°C]	Amplifikatlänge [bp]
5,8S	UN	TGT GAA CTG CAG GAC ACA TG	56,8	–
<i>An.claviger</i> s.s.	AC	CTA GCA AGT GCA CTG TGT CC	62,0	269
<i>An.petragrani</i>	AP	GCA ACA CTT TGG TGG CCA C	60,0	367

Die Reaktionsbedingungen für die artdiagnostische PCR mussten empirisch ermittelt werden. Wegen der ähnlichen Schmelztemperaturen der speziesspezifischen Primer und der Primer 5,8S bzw. 28S wurde dasselbe Thermoprofil wie für die Amplifikation der ITS2-Region gewählt. Bis auf den Austausch des 28S-Primers durch einen speziesspezifischen Primer war auch die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes gleich. Zunächst wurde nur jeweils einer der artspezifischen Primer mit dem 5,8S-Primer kombiniert. Ein 50 µl-Reaktionsansatz setzte sich demnach wie folgt zusammen:

10xPuffer	100mM Tris-HCl, pH 8,3; 500mM KCl
MgCl ₂	1mM
dNTPs	je 200µM
5,8S	200nM
AP oder AC	200nM
Taq-Polymerase	2,5 Einheiten
dH ₂ O	ad 50 µl
DNA-Lösung	1 µl

Initial-Denaturierung	94 °C	3 min	 35 Zyklen
Denaturierung	94 °C	1 min	
Primer-Annealing	51 °C	45 sec	
Extension	72 °C	1 min	
finale Elongation	72 °C	10 min	

Das Ergebnis der artspezifischen PCR wurde auf einem 1,5 %igen Agarosegel überprüft. Abb. 9 zeigt, dass unter den gewählten Reaktionsbedingungen einzelne, distinkte Banden im Gel zu erkennen sind. Unspezifische Nebenprodukte oder diffuse Hintergrundfärbung sind nicht vorhanden. Die Größe der gebildeten Amplifikate stimmen mit den theoretisch ermittelten Fragmentlängen von 269 bp für *An. claviger* s.s. und 367 bp für *An. petragani* überein.

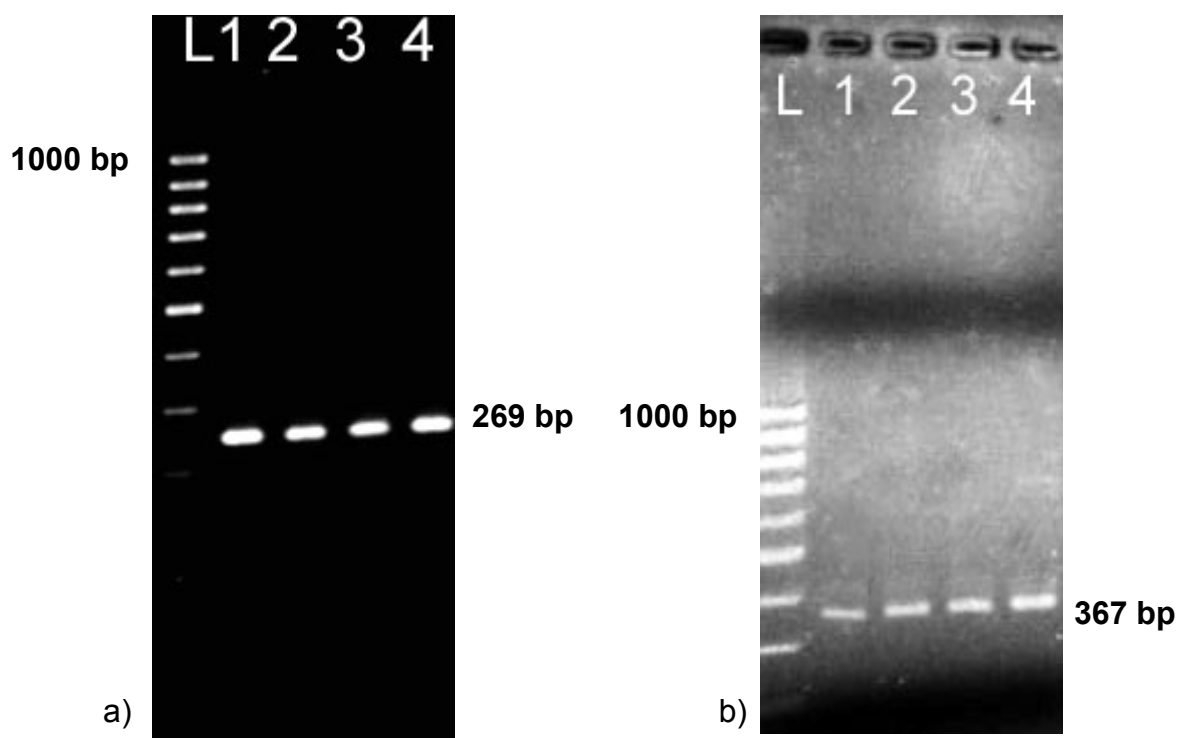


Abb.9: Amplifikate von *An. claviger* s.s. von Is 1-4 (a) und *An. petragani* von Serrania 1-4 (b)
L = 100 bp DNA-Größenmarker
a) Spuren 1-4 = *An. claviger* s.s.
b) Spuren 1-4 = *An. petragani*

4.1.3 Multiplex-PCR

Die Artidentifizierung brachte saubere und reproduzierbare Ergebnisse, wenn der Universalprimer mit einem der beiden speziesspezifischen Primer kombiniert wurde. Ziel der Entwicklung sollte aber eine Multiplex-PCR sein, in der der Universalprimer gleichzeitig mit beiden speziesspezifischen Primern eingesetzt wurde. Während der Universalprimer bei der DNA-Amplifikation an die DNA beider in Frage kommender Mückenspezies binden sollte, durfte von den beiden speziesspezifischen Primern je nach Mückenspezies nur einer alternativ hybridisieren.

Während das Thermoprofil bei der Multiplex-PCR unverändert blieb, sah der 50 µl-Reaktionsansatz wie folgt aus:

10xPuffer	100mM Tris-HCl, pH 8,3; 500mM KCl
MgCl ₂	1mM
dNTPs	je 200µM
5,8S	200mM
AP	200nM
AC	200nM
Taq-Polymerase	2,5 Einheiten
dH ₂ O	ad 50 µl
DNA-Lösung	1 µl

Auch bei der Multiplex-PCR wurden saubere PCR-Produkte von spezifischer Länge gebildet (Abb. 10). Der Erfolg der Multiplex-PCR beweist, dass weder Interaktionen zwischen den Primern noch Kreuz-Hybridisierung der Primer mit der heterologen DNA auftreten.

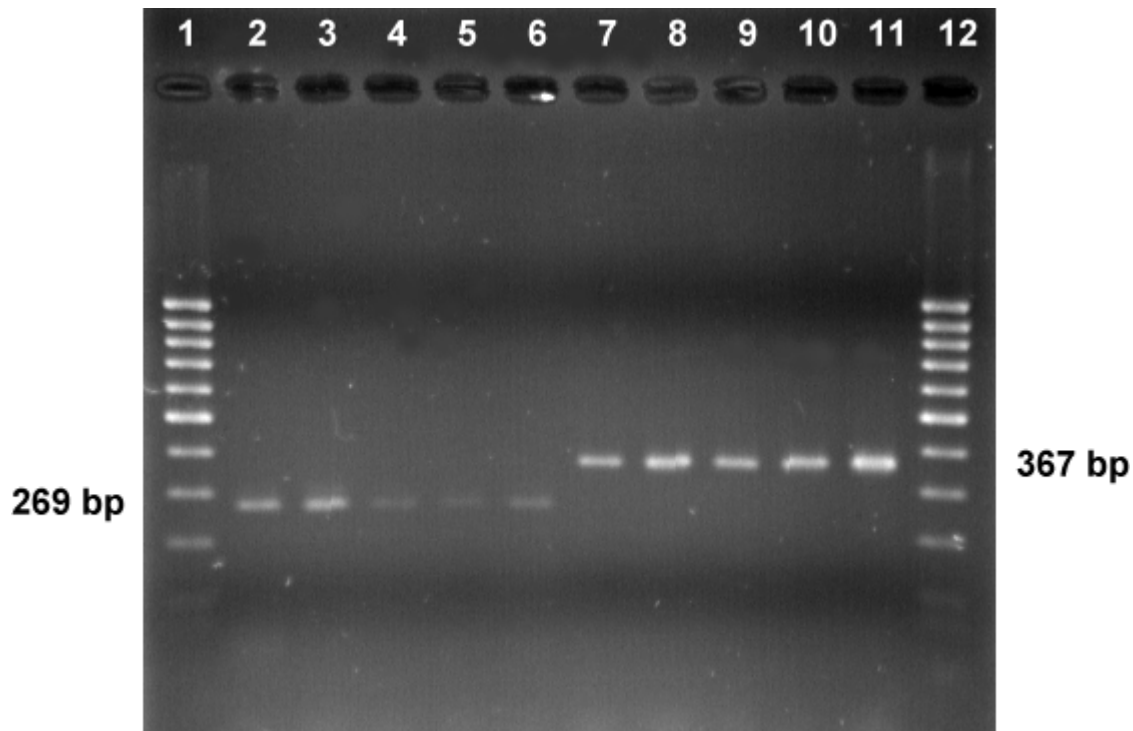


Abb. 10: Amplifikate von *An. claviger* s.s. (269 bp) und *An. petragrani* (367 bp) nach Multiplex-PCR
 Spuren 1, 12 = 100 bp DNA-Größenmarker
 Spuren 2-6 = *An. claviger* s.s.
 Spuren 7-11 = *An. petragrani*

4.1.4 Spezifität der artdiagnostischen PCR

Bei der Kontrolle der Spezifität der artdiagnostischen PCR mit Hilfe der Multiplex-PCR kam es mit einer Ausnahme bei keiner anderen Art als *An. claviger* s.l. zu einer DNA-Amplifikation. Interessanterweise entstand aber bei Einsatz von *An. beklemeshevi*-DNA ein PCR-Produkt, welches ungefähr der Länge des *An. petragrani*-spezifischen Amplifikats entsprach. Bei der anschließenden PCR mit jeweils nur einem der artspezifischen Primer stellte sich heraus, dass der *An. claviger* s.s.-spezifische AC-Primer für die Amplifikation verantwortlich war (Abb. 11). Die Sequenzierung des Amplifikats ergab eine Fragmentlänge von 357 bp. Es zeigte sich, dass die ersten zehn Nukleotide des AC-Primers am 3'-Ende exakt komplementär zu derjenigen Nukleotidsequenz von *An. beklemeshevi* waren, mit der der AC-Primer hybridisierte. Insgesamt stimmten sogar 16 Nukleotide des 20meren AC-Primers mit der Sequenz von *An. beklemeshevi* überein. Eine stufenweise Erhöhung der Hybridisierungs-Temperatur von 50 auf 60 °C konnte die Amplifikation eines PCR-Produktes mit *An. beklemeshevi*-DNA nicht verhindern.

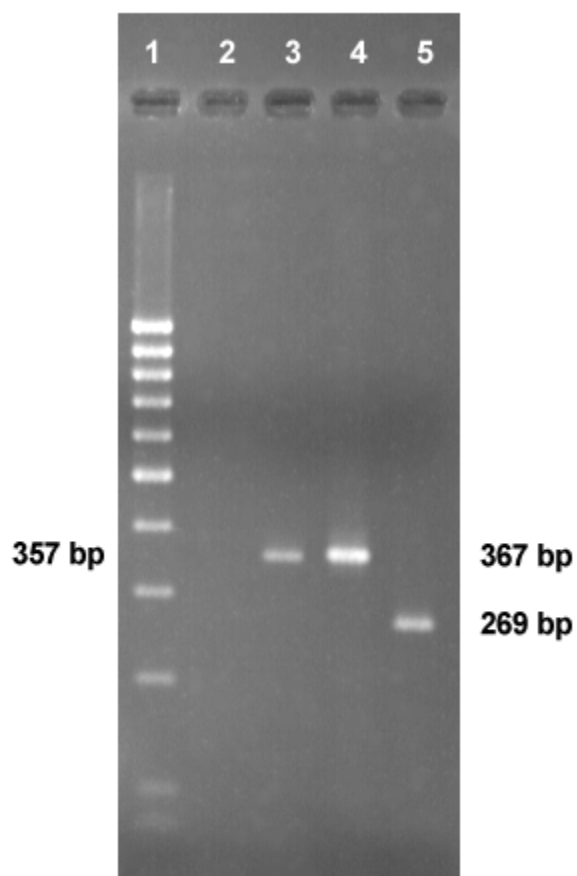


Abb. 11: PCR-Produkte von *An. beklemeshevi*, *An. claviger* s.s. und *An. petragani*

- Spur 1 = 100 bp DNA-Größenmarker;
- Spur 2 = *An. beklemeshevi* DNA, amplifiziert mit den Primern 5,8S und AP
- Spur 3 = *An. beklemeshevi* DNA, amplifiziert mit den Primern 5,8S und AC
- Spur 4 = *An. petragani* DNA, Multiplex-PCR
- Spur 5 = *An. claviger* s.s. DNA, Multiplex-PCR

4.1.5 Identifizierung von Individuen des *An. claviger*-Komplexes

Um die artdiagnostische PCR zu evaluieren, wurde die DNA von 592 im Freiland gesammelten Mücken des *An. claviger*-Komplexes extrahiert und mittels der spezifischen PCR amplifiziert. Die Ergebnisse der PCR stimmten mit der morphologischen Identifizierung aller 307 Mücken der Spezies *An. claviger* s.s. und aller 100 Individuen der Art *An. petragani* überein. Von den verbleibenden 185, zuvor lediglich dem *An. claviger*-Komplex zugeordneten Individuen konnten 172 mit der PCR zweifelsfrei als *An. claviger* s.s. identifiziert werden. Bei einer Mücke handelte es sich um *An. petragani*. Bei 12 Mücken entstand trotz Variationen in der dem PCR-Reaktionsansatz zugegebenen Menge an DNA und Primern kein PCR-Produkt. Zur Kontrolle der DNA-Qualität wurde bei diesen Mücken deshalb versucht, mit Hilfe der 5,8S- und 28S-Primer die gesamte ITS2-Region zu amplifizieren. Auch in diesem Fall kam es zu keiner DNA-Amplifikation.

In Tabelle 4 sind die PCR-Identifizierungsergebnisse aller untersuchten Mücken zusammengefasst:

Tab. 4: Resultate der artdiagnostischen PCR im Vergleich mit der morphologischen Vorbestimmung

Land	Lokalisation	Anzahl Mücken	morphologische Identifizierung	PCR Identifizierung
Frankreich	Aisne, Aube, Bas-Rhin, Corrèze, Côte d'Or, Doubs, Haute-Corse, Haute-Marne, Haut-Rhin, Haute-Savoie, Ille-et-Villaine, Indre, Loire, Loire-Atlantique, Maine-et-Loire, Meurthe-et-Moselle, Oise, Puy-de-Dôme, Saône-et-Loire	203	<i>An. claviger</i> s.s. ^a	<i>An. claviger</i> s.s.
	Gard, Haute-Corse, Hérault, Tarn, Var	94	<i>An. petragani</i> ^a	<i>An. petragani</i>
	Tarn	3	<i>An. claviger</i> s.l. ^b	2 <i>An. claviger</i> s.s. 1 <i>An. petragani</i>
Spanien	Serrania	6	<i>An. petragani</i> ^a	<i>An. petragani</i>
Schottland	Highland, Strathclyde	10	<i>An. claviger</i> s.s. ^a	<i>An. claviger</i> s.s.
England	North Humberland	1	<i>An. claviger</i> s.s. ^a	<i>An. claviger</i> s.s.
Holland	Zuidholland	39	<i>An. claviger</i> s.l. ^b	<i>An. claviger</i> s.s.
Dänemark	Himmerland	6	<i>An. claviger</i> s.s. ^a	<i>An. claviger</i> s.s.
Schweden	Öland	3	<i>An. claviger</i> s.s. ^a	<i>An. claviger</i> s.s.
Tschechische Republik	Böhmen	5	<i>An. claviger</i> s.s. ^a	<i>An. claviger</i> s.s.
Österreich	Salzburg	48	<i>An. claviger</i> s.s. ^a	<i>An. claviger</i> s.s.
Deutschland	Bonn	129	<i>An. claviger</i> s.l. ^b	117 <i>An. claviger</i> s.s. 12 n. i.
	Schwarzwald, Mecklenburg	31	<i>An. claviger</i> s.s. ^a	<i>An. claviger</i> s.s.
Israel	Banias	14	<i>An. claviger</i> s.l. ^b	<i>An. claviger</i> s.s.

^a Individuen wurden vor der PCR morphologisch als jeweilige Spezies identifiziert^b Individuen wurden morphologisch nur bis zur Komplexebene vorbestimmt
n.i. = nicht identifizierbar

4.2 Populationsdifferenzierung von *An. claviger* s.s. mittels PCR-SSCP

4.2.1 PCR-SSCP der ND4-Region

Für die populationsgenetischen Untersuchungen der Mücken anhand der ND4-Region der mitochondrialen DNA mit Hilfe der PCR-SSCP wurden sechs Populationen unterschiedlicher Herkunft von *An. claviger* s.s. mit jeweils mindestens 25 Individuen herangezogen. Von weiteren 25 Populationen wurden jeweils mindestens fünf Individuen untersucht. Insgesamt wurden 365 Individuen auf Populationsunterschiede analysiert.

4.2.1.1 Amplifikation der ND4-Region

Die PCR der ND4-Region mit den Primern ND4ar und ND4c ergab Amplifikate einer Länge von etwa 700 bp. Diejenigen von sechs Individuen der Population Charolais sind in Abbildung 12 beispielhaft dargestellt.

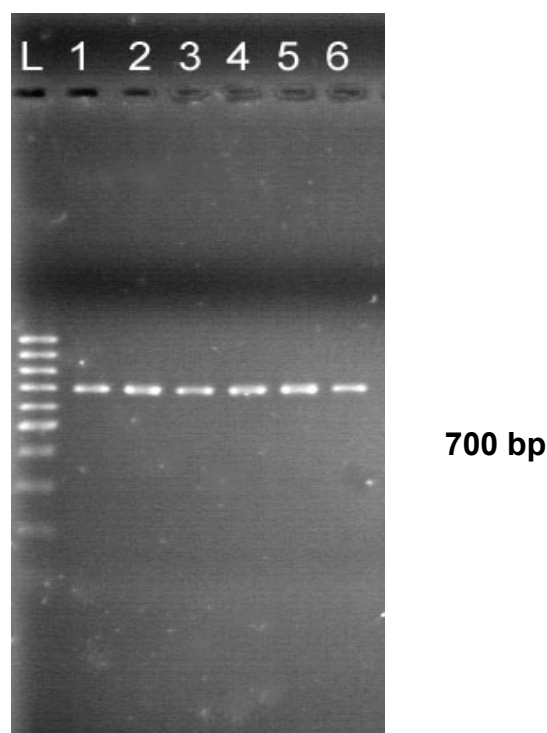


Abb. 12: Amplifikate der ND4-Region von *An. claviger* s.s.
 L = 100 bp-Größenmarker
 Spuren 1-6 = Ch 1-6

Mit den Primern ND4ar, ND4ar₂, ND4c und ND4c₂ wurden insgesamt 43 Individuen sequenziert: jeweils 3 Mücken der Populationen BN, Ch, H, Mv, Sb und Sw und jeweils eine weitere bei den 25 übrigen in Tab. 2 aufgeführten Populationen.

Tab. 5: Charakteristika der Primer für die Sequenzierung der ND4-Region

Primer	Primer-Nukleotidsequenz (5'→3')	Schmelz- temperatur [°C]	Amplifikatlänge [bp]
ND4ar ₂	GTT CAT CTG GTT TAT TTT TG	52	344
ND4c ₂	TAC TTC GTC TTC CCA TAC	54	350

Als PCR-Protokoll wurde das gleiche wie für die Amplifikation der gesamten ND4-Region verwendet, welches in Abschnitt 3.2.3.1 beschrieben ist. Vor der Sequenzierung der ND4-Teilstücke wurde das Ergebnis der PCR auf einem Agarosegel kontrolliert. Die Banden der PCR-Produkte entsprachen den theoretisch zu erwartenden Fragmentlängen von 344 bp für das Primerpaar ND4c und ND4ar₂ und 350 bp für das Primerpaar ND4ar und ND4c₂ (Abb. 14).

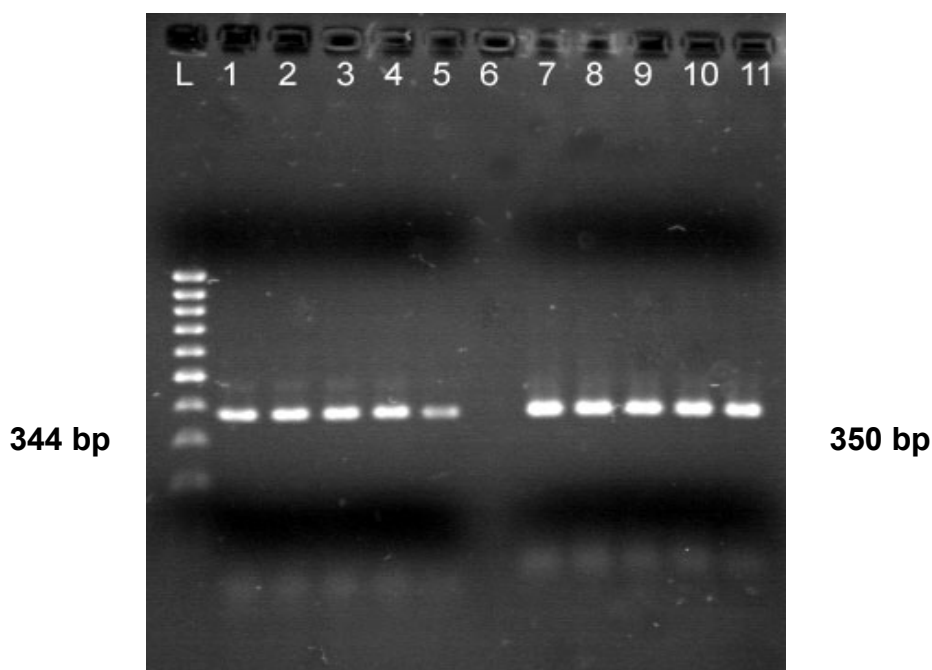


Abb. 14: Amplifikate der beiden ND4-Teilregionen von *An. claviger* s.s.
 L = 100 bp DNA-Größenmarker
 Spuren 1-5 = PCR mit den Primern ND4c und ND4ar₂
 Spuren 7-11 = PCR mit den Primern ND4ar und ND4c₂

4.2.1.3 Restriktionsspaltung der ND4-Region

Da die Sensitivität der SSCP-Methode bei einer Fragmentlänge unter 300 bp maximale Werte erreicht, wurde die komplett amplifizierte ND4-Region unter Verwendung der Restriktionsendonuklease *DraI* in vier kürzere Fragmente von 4 bp, 213 bp, 273 bp und 210 bp Länge geschnitten (Abb. 15). Abbildung 16 zeigt die Lage der Schnittstellen des Restriktionsenzym in der ND4-Sequenz. Die längeren drei Restriktionsfragmente sollten für die SSCP ausgewertet werden, während das 4 bp lange Bruchstück vernachlässigt wurde.

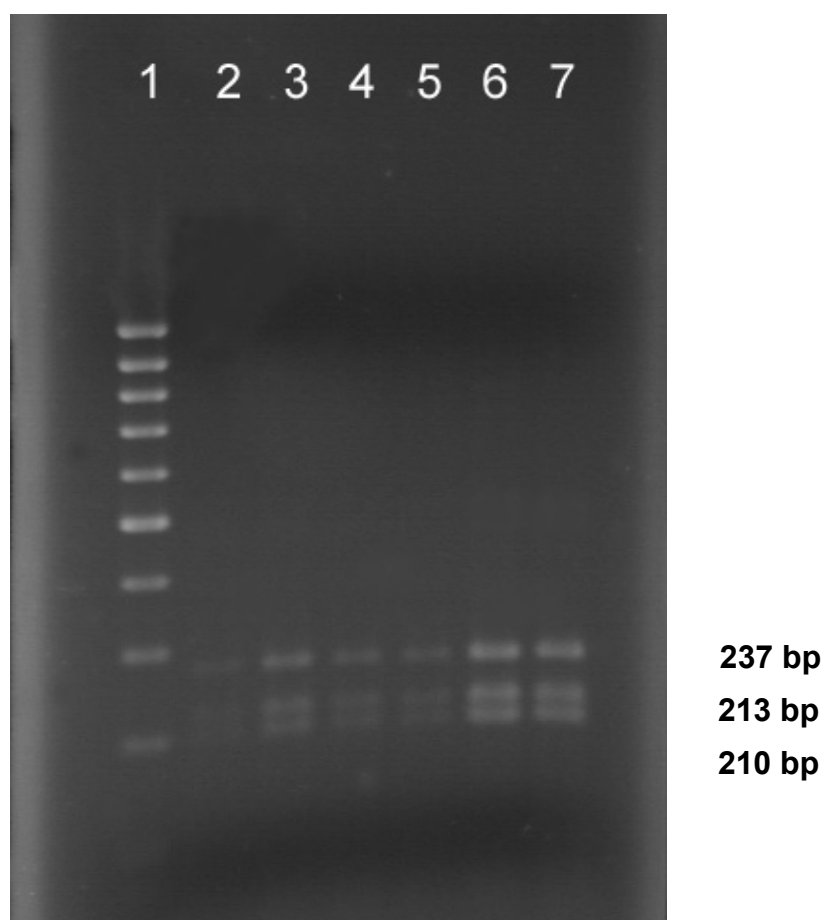


Abb. 15: PAGE der Spaltprodukte der ND4-Amplifikate von *An. claviger* s.s. nach Restriktionsspaltung mit *DraI*, beispielhaft anhand der Mücken 1-6 der Population Bonn (BN)
 Spuren 1-6 = BN 1-6
 L = 100 bp DNA-Größenmarker

AAAGGCTCATGTTGAAGCCCCGGTTGCGGGTCAATAATTTTAGCAGGAATTTTATTAAAGTTAGGGGGGTACGG
 TTTCCGAGTACAACCTTCGGGGCCAACGCCCAAGTTATTTAAATCGTCCTTAAATAATTTCAATCCCCCATGCC
 1

TTTATTGCGTATATTTTCTTTACTACAAATTTCTGGTATTAAATATAATTATTGATGAATTAGAATTAGTTTAGT
 AAATAACGCATATAAAAGAAATGATGTTTAAAGACCATAATTTATATTAATACTACTTAATCTTAATCAAATCA
 76

DraI

AGGGGGTGTATTAATTAGATTAGTGTGTTTACGTCAAACGATTT/AAAGGCTTTAATTGCTTATTCTTCAGTTG
 TCCCCACATAATTAATCTAATCACACAAATGCAGTTTGACTAAA/TTTCCGAAATTAACGAATAAGAAGTCAAC
 151

CTCATATAGGAATTGTATTAAGTGGTTTATTAACAATATCTTATTGAGGTTTAACTGGTTCTTATGCTCTAATAA
 AGTATATCCTTAACATAATTCACCAAATAATTGTTATAGAATAACTCCAAATTGACCAAGAATACGAGATTATTA
 226

TTGCTCATGGTTTATGTTTCATCTGGTTTATTTGTTAGCAAATATTTCTTATGAACGTATGGGAAGACGAAGTATA
 GACGAGTACCAAATACAAGTAGACCAAATAACAATCGTTTATAAGAATACTTGCCATACCCCTTCTGCTTCATAT
 301

TTAATTAATAAGGGCTTATTAAATTTTATACCAACATTGAGTTTATGATGATTTTTATTATGTTTCAGGAAATATA
 AATTAATTATTTCCGAATAATTTAAATATGGTTGTAACCTCAAATACTACTAAAAATAATACAAGTCCTTTATAT
 376

DraI

GCAGCCCTCCTACTTT/AAATTTATTAGGGGAAATTTCTTTATTAAATAGAATTGTTAGTTGATCTTGAGTAAC
 CGTCGGGGAGGATGAAA/TTTAAATAATCCCTTTAAAGAAATAATTTATCTTAACAATCACTAGAACTCATG
 451

AATAATTATATTGGCTTTTTTGTCTTTTTTTAGAGCGGCTTATTCTTTATATTTATTTGCTTATAGACAACATGG
 TTATTAATATAACCGAAAAAACAGAAAAAATCTCGCCGAATAAGAAATATAAAATAAACGAATATCTGTTGTACC
 526

TAAACTTATTCAGGGGTTTATTTTTTTTTCAGTCGGTACTATACGGGAATTTTTATTATTAATATTACATTGATT
 ATTTTGAATAAGTCCCCAAATAAAAAAAGTCAGCCATGATATGCCCTTAAAAATAATAATTATAATGTAACATA
 601

DraI

GACCTTT/AAAT
 CTGGAAA/TTTA
 676

Abb. 16: Schnittstellen der ND4-Region von *An. claviger* s.s. durch die Restriktionsendonuklease *DraI*

4.2.1.4 PAGE der ND4-Spaltprodukte

Die Spaltprodukte wurden denaturiert und die resultierenden DNA-Fragmente, die z.T. in der renaturierten, z.T. aber auch in der denaturierten Form in spezifischen Sekundär- und Tertiärstrukturen verblieben, auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Bandenmuster innerhalb und zwischen den verschiedenen Populationen verglichen. Proben, deren Bandenmuster sich von dem der anderen Proben auf einem Gel unterschieden, wurden nochmals nebeneinander auf ein neues Gel aufgetragen, um gleiche Haplotypen hervorzuheben und unterschiedliche Haplotypen voneinander abgrenzen zu können. Die in den Abbildungen 17 bis 27 dargestellten Gele zeigen die Haplotypen der Populationen mit über 25 untersuchten Individuen.

Population Charolais:

Die Individuen der Population Charolais (Ch) gehörten zu den ersten, die in dieser Arbeit auf Polymorphismen in der ND4-Region untersucht wurden. Auf Erfahrungen bei der Auswertung der Bandenmuster konnte somit noch nicht zurückgegriffen werden. Abweichungen wie bei den Individuen Ch 10, 17, 26 oder 27 in Abb. 17, bei denen jeweils eine Doppelbande unterhalb der 900 bp- Marke zu erkennen ist, wurden daher als mögliche Hinweise auf eine Mutation gedeutet. Obwohl anstatt der Doppelbande bei den übrigen Individuen jeweils nur eine breite, unscharfe Bande zu erkennen ist, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dieser um zwei nicht voneinander zu differenzierende Banden handelt, die annähernd die gleiche Laufgeschwindigkeit auf dem Polyacrylamidgel aufwiesen. Tatsächlich zeigten sich bei einer Wiederholung des Experimentes zwei Banden auf dem Gel (Abb. 18), und auch eine anschließende DNA-Sequenzierung erbrachte eine Übereinstimmung in der Nukleotidabfolge der Proben (Abb. 28). In den folgenden Untersuchungen wurden entsprechend geringe Abweichungen nicht als Mutation gewertet.

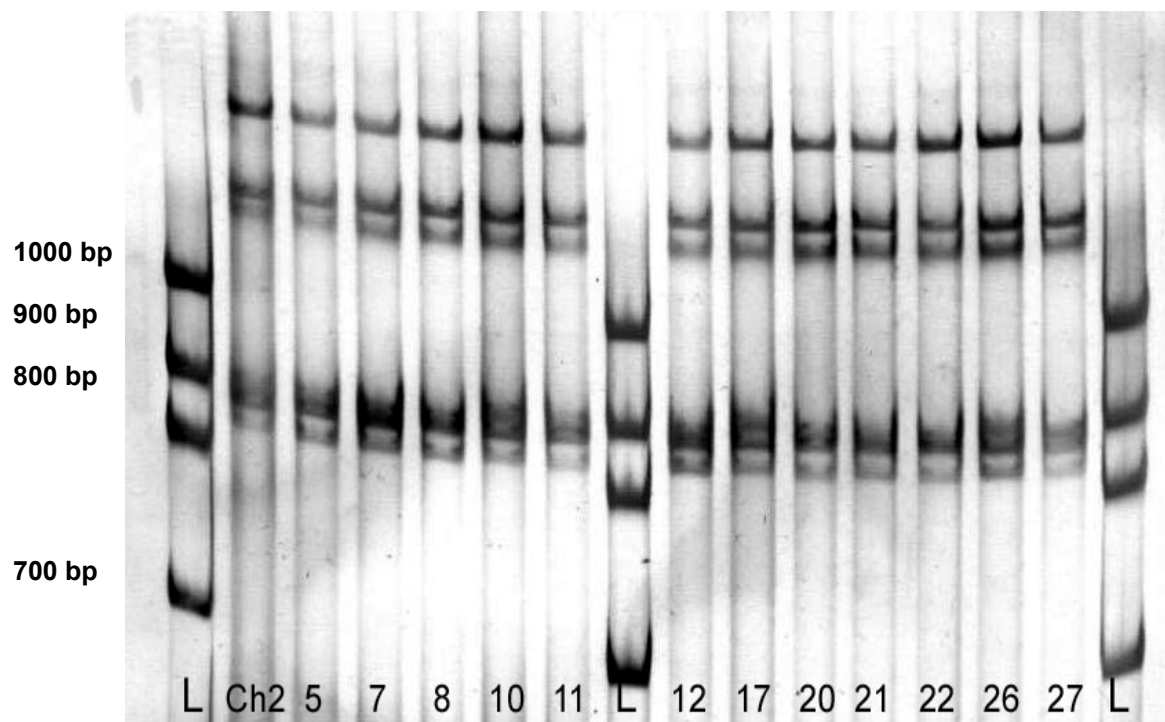


Abb. 17: PAGE der Amplifikate aus der ND4-Region von *An. claviger* s.s. der Population Charolais (Ch), 1. Durchgang
L = 100 bp DNA-Größenmarker

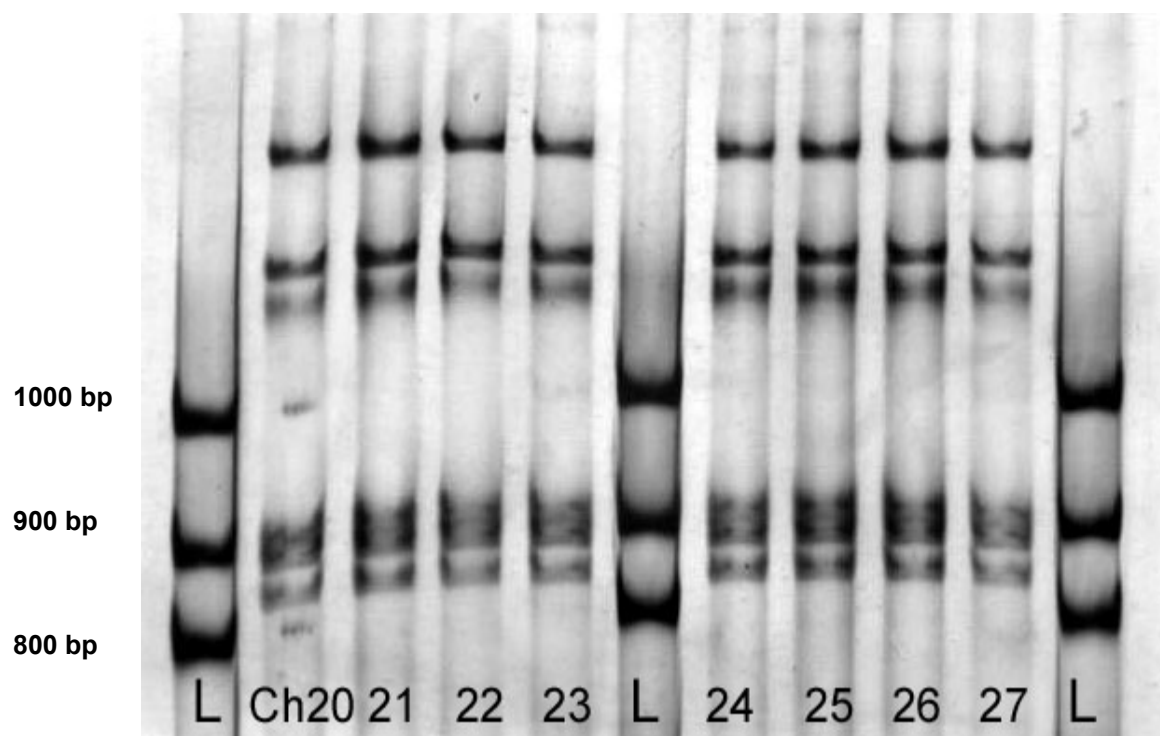


Abb. 18: PAGE der Amplifikate aus der ND4-Region von *An. claviger* s.s. der Population Charolais (Ch), 2. Durchgang
L = 100 bp DNA-Größenmarker

Von den 40 untersuchten *An. claviger* s.s. der Population Charolais wurden die Bandenmuster von Ch1, 4, 10, 17, 26, 27, 886/1 und 886/3 im ersten Untersuchungsdurchgang als abweichend von dem Muster der übrigen Individuen gedeutet, die von Ch5 und 7 im anschließenden Durchgang. Allein bei dem Individuum Ch5 wiederholte sich diese Abweichung auch in einem dritten Durchgang der Untersuchung. Bei der Sequenzierung der DNA dieser Mücke konnte jedoch weder innerhalb der Population noch im Vergleich zu anderen Populationen eine Mutation festgestellt werden (vgl. Abb. 28).

Population Bonn:

Bei der Population Bonn (BN) wichen die Bandenmuster bei den Individuen 5 und 7 im 1. Untersuchungsgang (Abb. 19) und bei BN8 im 2. Durchgang (Abb. 20) von denen der übrigen Proben ab. So zeigten sich bei den Mücken BN5 und 7 zusätzliche Banden unterhalb von 800 bp und bei BN8 eine zusätzliche Bande bei etwa 1400 bp, die bei den übrigen Proben nicht zu erkennen war.

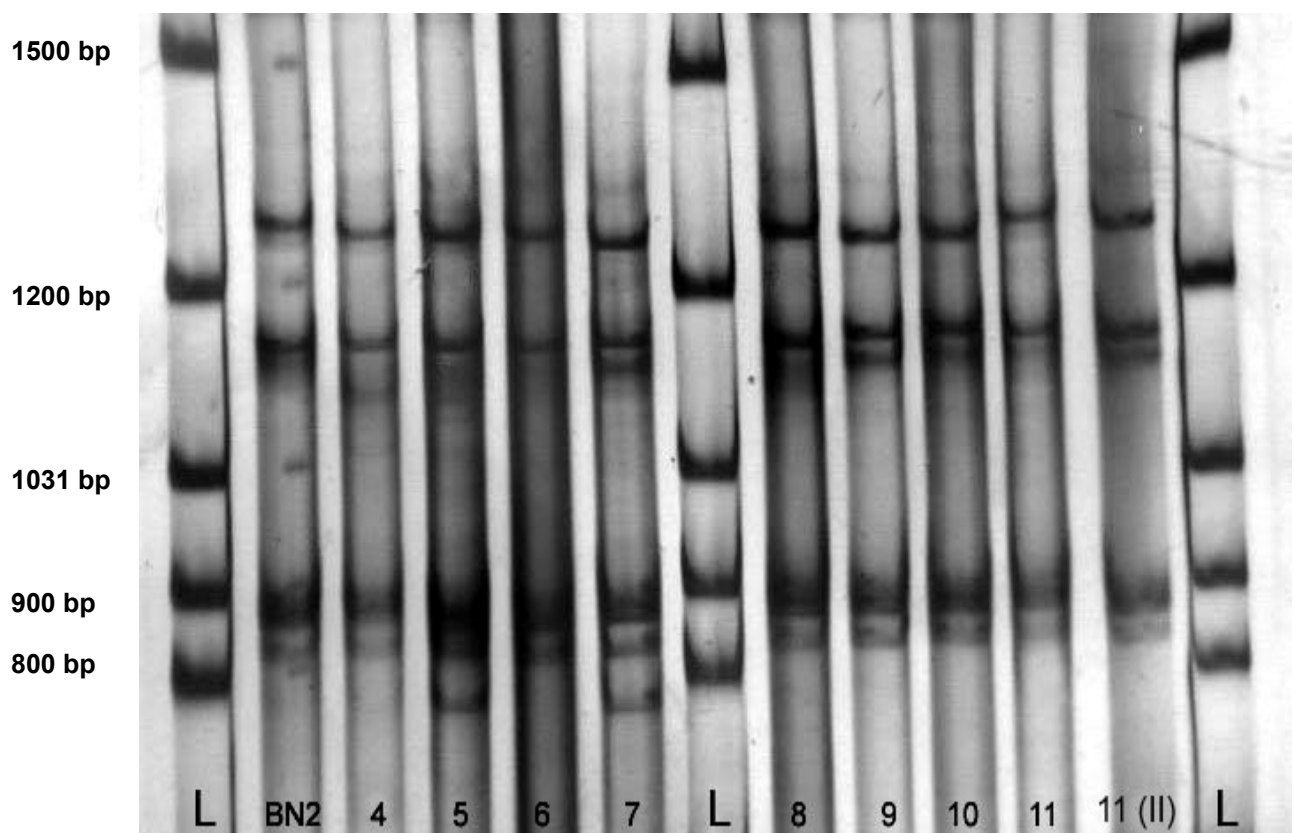


Abb. 19: PAGE der Amplifikate aus der ND4-Region von *An. claviger* s.s. der Population Bonn (BN), 1. Durchgang
L = 100 bp DNA-Größenmarker Plus

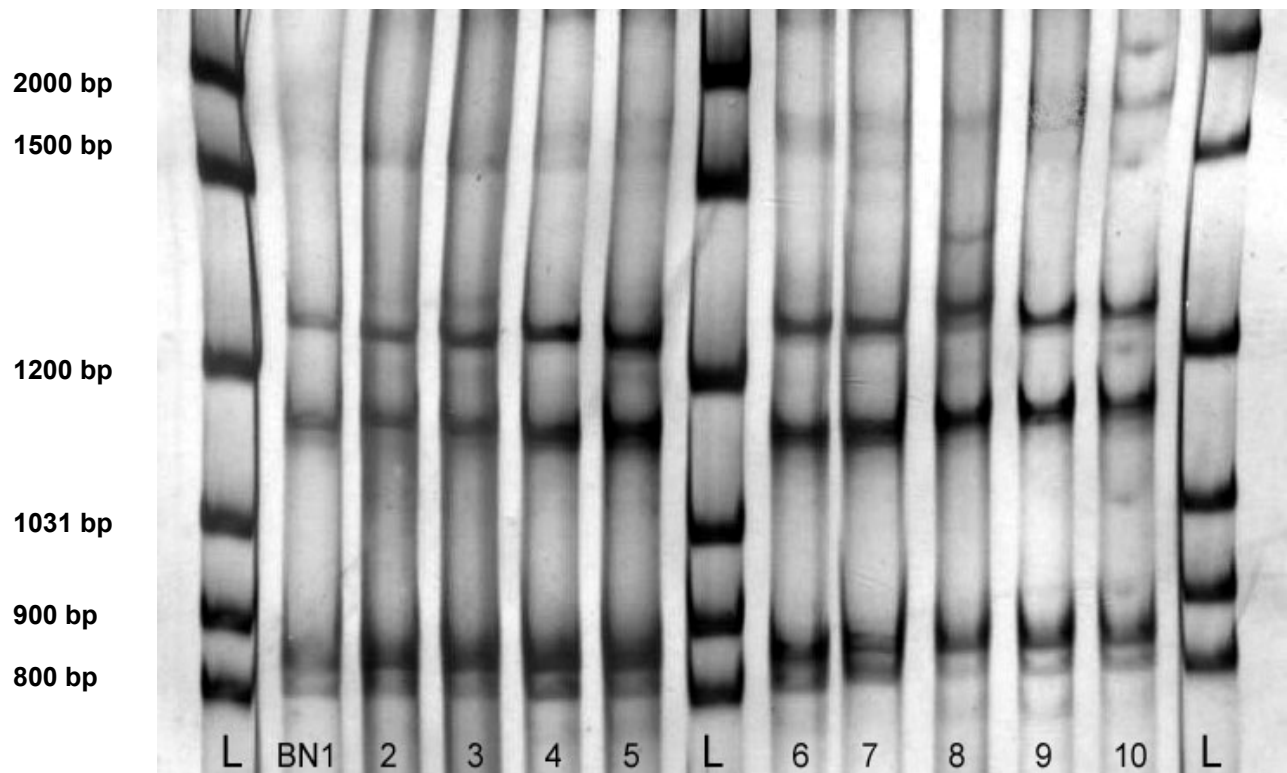


Abb. 20: PAGE der Amplifikate aus der ND4-Region von *An. claviger* s.s. der Population Bonn (BN), 2. Durchgang
 L = 100 bp DNA-Größenmarker Plus

Bei der anschließenden Sequenzierung konnten Unterschiede in der Nukleotidabfolge der Proben BN5, 7 und 8 allerdings weder im Vergleich zu Individuen derselben Population noch zu denen anderer Populationen festgestellt werden (vgl. Abb. 28).

Von den insgesamt 25 Individuen der Bonner Population konnte von allen bis auf BN12 und 21 eine SSCP durchgeführt werden. Bei diesen zwei Mücken konnte trotz wiederholter DNA-Extraktion und mehrfacher PCR-Wiederholungen mit unterschiedlichen Primer- und DNA-Konzentrationen keine DNA amplifiziert und somit auch keine SSCP durchgeführt werden.

Population Holland:

In der holländischen Population war im ersten Durchgang bei Individuum Nr. 3 eine deutliche Abweichung des Bandenmusters im Vergleich zu den restlichen Proben festzustellen (Abb. 21), welche bei der Wiederholung (Abb. 22) allerdings nicht mehr zu erkennen war. Die DNA der Mücke wurde im Anschluss sequenziert, ohne dass sich eine Abweichung in der Nukleotid-Abfolge zeigte (vgl. Abb. 28).

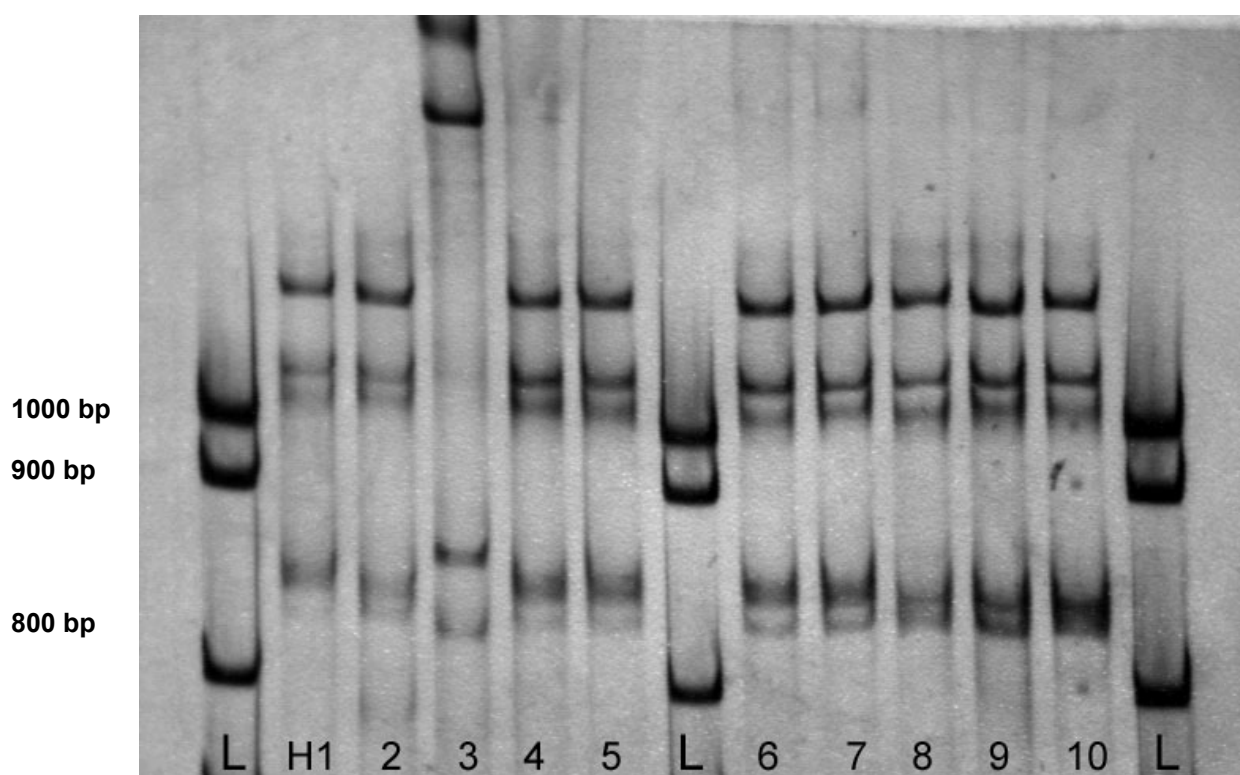


Abb. 21: PAGE der Amplifikate aus der ND4-Region von *An. claviger* s.s. der Population Holland (H), 1. Durchgang
L = 100 bp DNA-Größenmarker

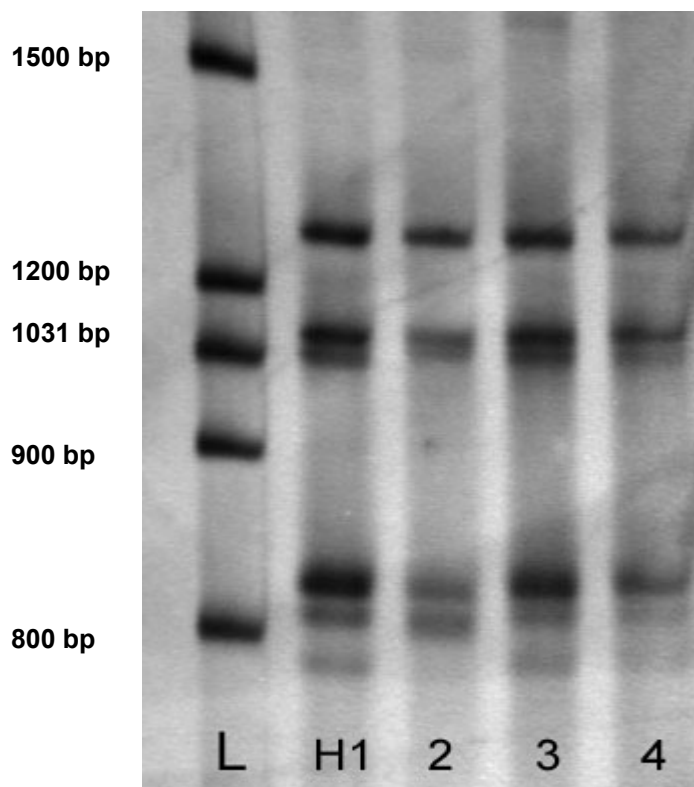


Abb. 22: PAGE der Amplifikate aus der ND4-Region von *An. claviger* s.s. der Population Holland (H), 2. Durchgang
 L = 100 bp DNA-Größenmarker Plus

Weiterhin zeigten sich vom Gros der Mücken abweichende Bandenmuster bei den Mücken H11, 24, 27 und 28 im zweiten Durchgang der SSCP. Diese Abweichungen konnten jedoch in einem dritten Versuchsdurchgang nicht bestätigt werden.

Die DNA der Mücken H23, 25, 26 und 29 erbrachte trotz zahlreicher Wiederholungen mit variierendem PCR-Protokoll keine Amplifikate, so dass diese Mücken für die SSCP nicht ausgewertet werden konnten.

Population Millevaches:

Am Beispiel der Individuen 9-16 der Population Millevaches soll auf die Schwierigkeiten der Interpretation der Polyacrylamid-Gele eingegangen werden. In Abbildung 23 zeigt sich bei Individuum Mv13 eine vermeintliche Doppelbande als vierte Bande von oben, die bei den anderen Individuen zunächst als einfache Bande erscheinen mag. Betrachtet man diese Bande bei allen acht Individuen jedoch genauer, so fällt auf, dass sich insbesondere bei Mv11 und Mv12, aber auch bei Mv 10, 14, 15 und 16 ebenfalls der Verdacht einer Doppelbande aufdrängt, deren zwei Banden allerdings enger zusammen liegen und kaum voneinander zu unterscheiden sind. (Anmerkung: Im Original sind die Banden auf den Gelen besser erkennbar als auf den eingescannten Abbildungen.).

Weiterhin ist bei den Mücken Mv13 und 14 jeweils eine deutliche, bei Mv9, 10, 11 und 15 etwas schwächer ausgeprägte zusätzliche Bande unterhalb von 800 bp zu erkennen.

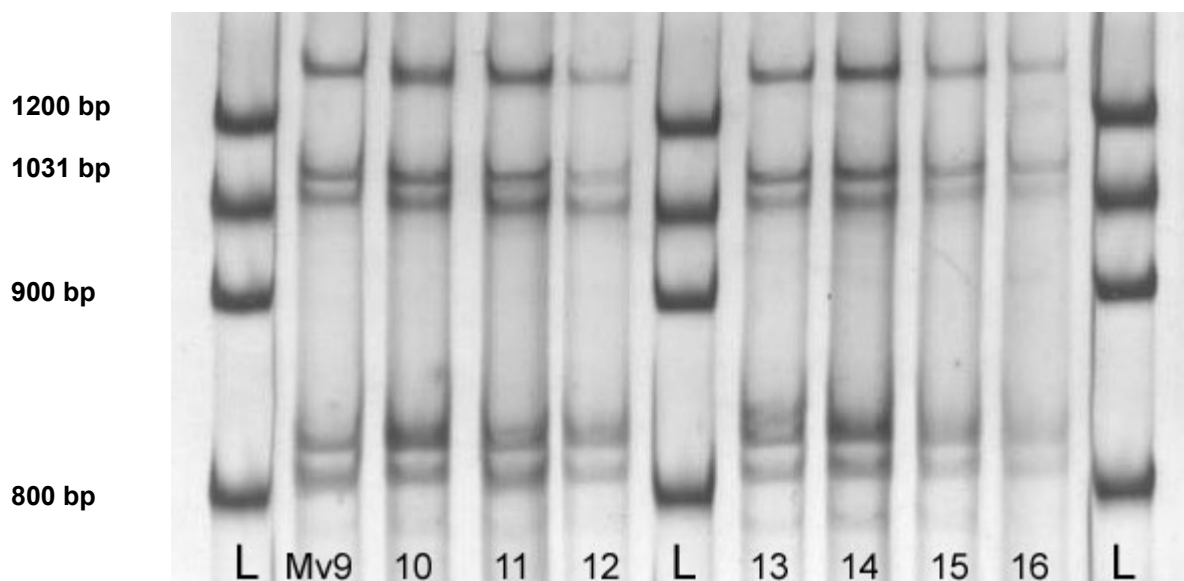


Abb. 23: PAGE der Amplifikate aus der ND4-Region von *An. claviger* s.s. der Population Millevaches (Mv), 1. Durchgang
L = 100 bp DNA-Größenmarker

Insgesamt gab es in der Population Millevaches bei der DNA von 37 Mücken nur vier Individuen mit Abweichungen des Bandenmusters, die auf eine Mutation hinwiesen. Bei den Mücken 733/1 und 733/2 zeigten sich diese Unterschiede bereits im ersten

Untersuchungsgang, bei Mv5 und 11 zeigte der erste Durchgang keine Abweichung (Abb. 23 & 24), jedoch der darauf folgende zweite Durchgang.

Obwohl diese Abweichungen in der PAGE niemals reproduzierbar waren, wurde bei der Sequenzierung der Individuen Mv5 und Mv6 (vgl. Abb. 28) jeweils eine Mutation im Vergleich zu den Populationen BN, Ch, H, Sw und Sb nachgewiesen (vgl. Kap. 4.2.1.5).

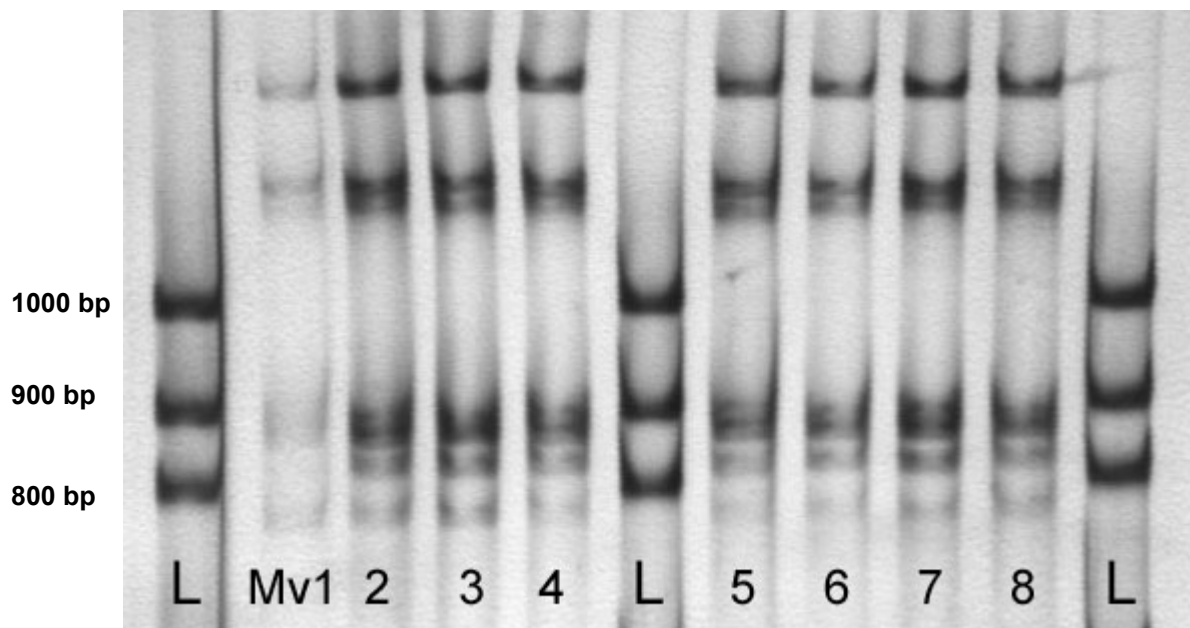


Abb. 24: PAGE der Amplifikate aus der ND4-Region von *An. claviger* s.s. der Population Millevaches (Mv), 1. Durchgang
L = 100 bp DNA-Größenmarker

Um einen direkten Vergleich mit den Individuen anderer Populationen zu erhalten, wurden die Proben Mv5 und Mv6 zusammen mit zufällig ausgewählten Individuen der Populationen BN, H, Ch und Sw erneut auf ein Gel aufgetragen, wobei Mv6 als Kontrolle für die Population Millevaches verwendet wurde. In diesem Vergleich waren allerdings keine Unterschiede in den Bandenmustern erkennbar, die auf die Mutation hindeuten könnten (Abb. 25).

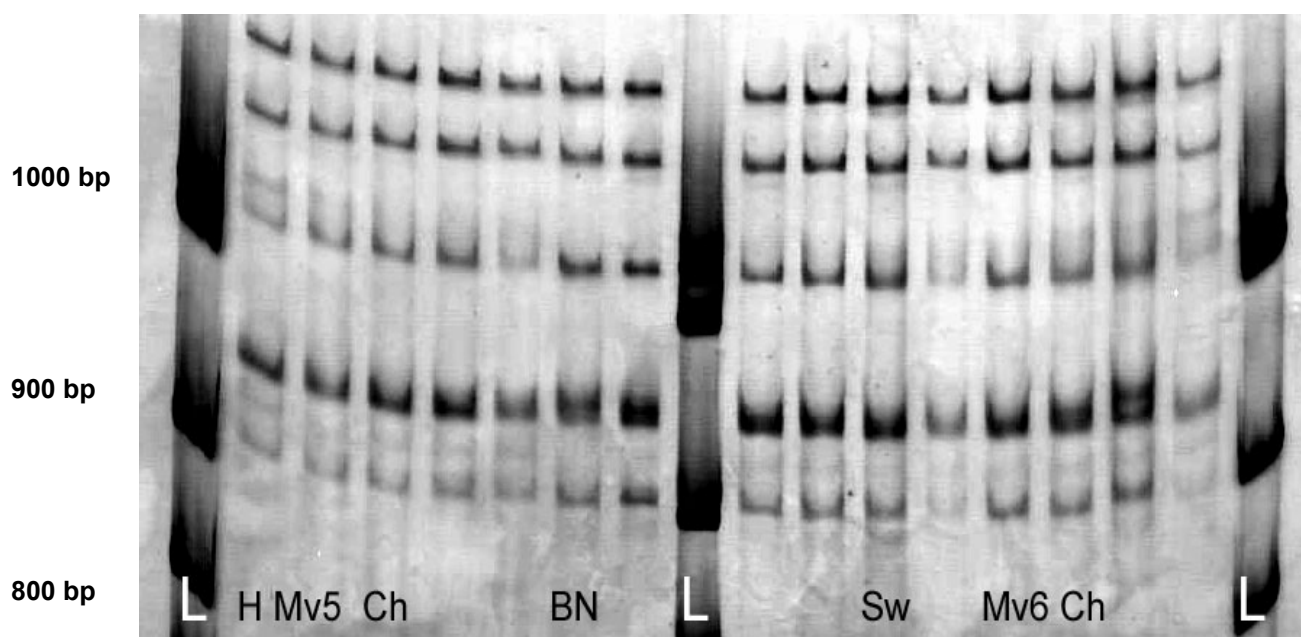


Abb. 25: PAGE der Amplifikate aus der ND4-Region von *An. claviger* s.s. der Populationen Millevaches (Mv), Holland (H), Charolais (Ch) und Schwarzwald (Sw)
 L = 100 bp DNA-Größenmarker
 (ohne Bezeichnung = Individuen, die für diese Untersuchung keine Bedeutung hatten)

Population Schwarzwald:

Bei der Population Schwarzwald ergaben sich bei den Individuen Sw3 und 1661/1 im ersten Untersuchungsdurchgang sowie bei Sw14 und 1661/3 im zweiten Durchgang der SSCP Abweichungen im Bandenmuster im Vergleich zu den anderen Proben. Bei erneuter Durchführung der gesamten Untersuchung mit PCR, Restriktionsspaltung und abschließender PAGE konnte dieses Ergebnis allerdings nicht reproduziert werden. Die Abbildungen 26 und 27 zeigen zwei Gele, auf denen Sw14 gemeinsam mit anderen Individuen derselben Population aufgetragen ist. Trotz der fehlenden Abweichung in der Wiederholung offenbarten sich bei der Sequenzierung der ND4-Region am Beispiel der Individuen Sw3 und 14 jeweils eine Mutation (vgl. Abb. 28 und Kap. 4.2.1.5).

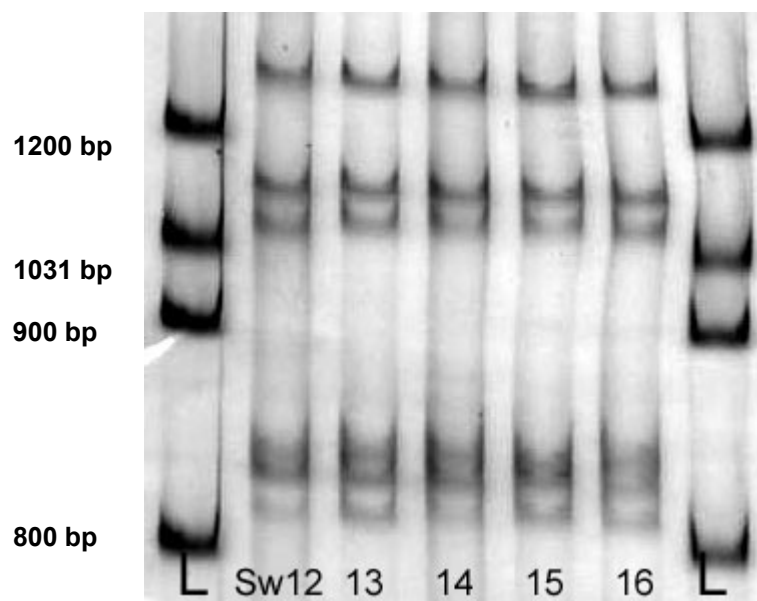


Abb. 26: PAGE der Amplifikate aus der ND4-Region von *An. claviger* s.s. der Population Schwarzwald (Sw), 1. Durchgang
L = 100 bp DNA-Größenmarker Plus

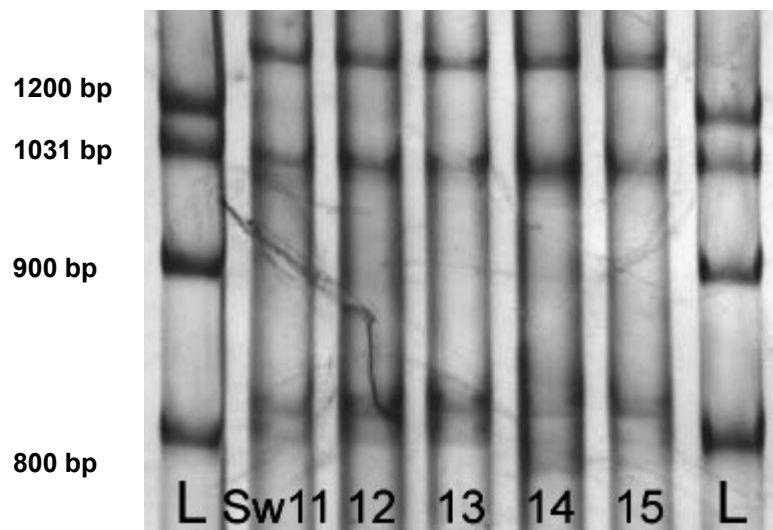


Abb. 27: PAGE der Amplifikate aus der ND4-Region von *An. claviger* s.s. der Population Schwarzwald (Sw), 2. Durchgang
L = 100 bp DNA-Größenmarker Plus

Population Salzburg:

Die ND4-Region der 40 Mücken der Population Salzburg (Sb) konnte weder durch Variationen des PCR-Protokolls noch mittels wiederholter DNA-Extraktionen mit den Protokollen nach COLLINS et al. (1987) oder nach GUY und STANEK (1991) amplifiziert werden. Bei der Mücke Sb1 wurde bei einer einzigen PCR ein Amplifikat der erwarteten Länge erzeugt; dies konnte jedoch nicht wiederholt werden. Lediglich die PCR mit den selbst entwickelten Primern ND4ar₂ und ND4c₂ (vgl. Kap. 4.2.1.2), die mit den ursprünglichen Primern kombiniert wurden, führten zur Bildung von DNA-Fragmenten, die für eine Sequenzierung genutzt werden konnten. Hierbei wurden keine Unterschiede in der Nukleotidabfolge der ND4-Region festgestellt (Abb. 28).

In den Tabellen 6 und 7 ist die Anzahl der Versuchsdurchgänge für die Individuen wiedergegeben, die in einem oder mehreren dieser Durchgänge Abweichungen in ihrem Bandenmuster, verglichen mit dem der anderen auf demselben Polyacrylamid-Gel, zeigten. Als Durchgang wird die Abfolge von PCR, Restriktionsspaltung und PAGE bezeichnet. Zum Teil wurde von diesen Individuen bzw. beispielhaft von einem Individuum aus jeder Population, eine Sequenzierung angeschlossen, deren Übereinstimmung ebenfalls aus den Tabellen ersichtlich ist. Tabelle 6 zeigt diese Ergebnisse bei den Populationen mit höchstens fünf untersuchten Individuen, Tabelle 7 bei jenen mit mindestens 25 untersuchten Individuen.

Tab. 6: Proben mit SSCP-Bandenmustern, die im Vergleich zu den anderen Mücken auf demselben Gel Unterschiede in einem oder mehreren von maximal vier Untersuchungsdurchgängen aufwiesen; hier: Populationen mit höchstens fünf untersuchten Individuen

Bezeichnung Individuum	abweichend 1.Durchgang SSCP	abweichend 2. Durchgang SSCP	abweichend 3. Durchgang SSCP	abweichend 4. Durchgang SSCP
1652 I (Strathclyde)	+	-	-	n.d.
1652 III (Strathclyde)	+	-	-	n.d.
1656 I (Ullapool)	+	-	-	n.d.
472 II (Allier)	+	-	-	n.d.
1148 III (Chapelle)	+	+	-	-
1375 VII (Orient)	+	-	-	n.d.
1375 VIII (Orient)	+	-	-	n.d.
1655 VI (Orient)	+	-	-	n.d.
+	= Abweichung von dem Bandenmuster anderer Proben auf demselben Gel			
-	= keine Abweichung			
n.d.	= nicht durchgeführt (aufgrund nicht reproduzierbarer Abweichung wurde kein 4. Durchgang durchgeführt)			

Wegen der wiederholten Abweichungen des Bandenmusters im Vergleich zu anderen Proben auf dem jeweiligen Gel wurde die ND4-Region der Mücke 1148 III der Population Chapelle (Ch) anschließend sequenziert. Dabei ergab sich keine Variation in der Nukleotidabfolge im Vergleich zu den Sequenzen der Populationen BN, Ch, H und Sb (vgl. Abb. 28).

Tab. 7: Proben mit SSCP-Bandenmustern, die im Vergleich zu den anderen Mücken auf demselben Gel Unterschiede in einem oder mehreren von maximal drei Untersuchungsdurchgängen aufwiesen; hier: Populationen mit mindestens 25 untersuchten Individuen

Population	Bezeichnung Individuum	abweichend 1. SSCP	abweichend 2.SSCP	abweichend 3.SSCP	DNA-Sequenz abweichend
Bonn (BN)	2	-	-	n.d.	-
	5	+	-	-	-
	7	+	-	-	n.d.
	8	-	+		n.d.
Holland (H)	1	-	-	-	-
	3	+	-	-	-
	11	-	+	-	n.d.
	24	-	+	-	n.d.
	27	-	+	-	n.d.
	28	-	+	-	n.d.
Millevaches (Mv)	5	-	+	-	+
	6	-	-	-	+
	11	-	+	-	n.d.
	733/1	+	-	-	n.d.
	733/2	+	-	-	n.d.
Charollais (Ch)	1	+	-	-	n.d.
	4	+	-	-	n.d.
	5	-	+	+	-
	7	-	+	-	n.d.
	10	+	-	-	n.d.
	17	+	-	-	-
	20	-	-	-	n.d.
	26	+	-	-	n.d.
	27	+	-	-	n.d.
	886V/1	+	-	-	n.d.
	886V/3	+	-	-	n.d.
Schwarzwald (Sw)	3	+	-	-	+
	14	-	+	-	+
	1661/1	+	-	-	n.d.
	1661/3	+	-	-	n.d.
Salzburg (Sb)	2	-	n.d.	n.d.	-
	3	n.d.	n.d.	n.d.	-

+

= Abweichung im Bandenmuster bzw. Unterschied in der Nukleotidsequenz im Vergleich zu den anderen in dieser Tabelle aufgeführten Populationen, sowie innerhalb derselben Population

-

= keine Abweichung bzw. kein Unterschied in der Nukleotidsequenz im Vergleich zu den anderen in dieser Tabelle aufgeführten Populationen, sowie innerhalb derselben Population

n.d.

= es wurde keine Sequenzierung bzw. SSCP durchgeführt

4.2.1.5 Sequenzvergleich der ND4-Region ausgewählter Populationen

Zur Kontrolle der SSCP-Ergebnisse wurde eine Sequenzierung der ND4-Region von jeweils drei ausgewählten *An. claviger* s.s.-Individuen der verschiedenen, in die Untersuchung einbezogenen Populationen durchgeführt. Es sollte festgestellt werden, ob die vorwiegende Homogenität der Bandenmuster tatsächlich die genetische Uniformität widerspiegelt. Bei reproduzierbaren Unterschieden im Bandenmuster einzelner Individuen sollte nachgeprüft werden, ob tatsächlich eine Mutation zu Grunde liegt.

Nach der Sequenzierung der ND4-Region von je drei Mücken der Populationen Charolais (Ch), Millevaches (Mv), Bonn (BN), Salzburg (Sb), Schwarzwald (SW) und Holland (H) mittels der Primer ND4ar, ND4c, ND4ar₂ und ND4c₂ ergab sich nach der Zusammensetzung der DNA-Teilstücke das in Abbildung 28 präsentierte Alignment.

```

Ch   1  AAAGGCTCATGTTGAAGCCCCGGTTGCGGGTTCAATAATTTTAGCAGGAATTTTATTAAA
Mv   1  .....
BN   1  .....
Sb   1  .....
Sw   1  .....
H    1  .....

Ch   61  GTTAGGGGGGTACGGTTTATTGCGTATATTTCTTTACTACAAATTTCTGGTATTAAATA
Mv   61  .....
BN   61  .....
Sb   61  .....
Sw   61  .....
H    61  .....

Ch   121 TAATTATTGATGAATTAGAATTAGTTTAGTAGGGGGTGTATTAATTAGATTAGTGTGTTT
Mv   121 .....
BN   121 .....
Sb   121 .....
Sw   121 .....G.....
H    121 .....

Ch   181 ACGTCAAACCTGATTTAAAGGCTTTAATTGCTTATTCTTCAGTTGCTCATATAGGAATTGT
Mv   181 .....
BN   181 .....
Sb   181 .....
Sw   181 .....
H    181 .....

Ch   241 ATTAAGTGGTTTATTAACAATATCTTATTGAGGTTTAACTGGTTCTTATGCTCTAATAAT
Mv   241 .....
BN   241 .....
Sb   241 .....
Sw   241 .....
H    241 .....

```

Ch	301	TGCTCATGGTTTATGTTTCATCTGGTTTATTTGTTAGCAAATATTTCTTATGAACGTATGG
Mv	301
BN	301
Sb	301
Sw	301
H	301
Ch	361	GAAGACGAAGTATATTAATTAATAAGGGCTTATTAAATTTTATACCAACATTGAGTTTAT
Mv	361
BN	361
Sb	361
Sw	361
H	361
Ch	421	GATGATTTTATTATGTTTCAGGAAATATAGCAGCCCCCTCCTACTTTAAATTTATTAGGGG
Mv	421G.....
BN	421
Sb	421
Sw	421
H	421
Ch	481	AAATTTCTTTATTAAATAGAATTGTTAGTTGATCTTGAGTAACAATAATTATATTGGCTT
Mv	481
BN	481
Sb	481
Sw	481
H	481
Ch	541	TTTGTCTTTTTTTAGAGCGGCTTATTCTTTATATTTATTGCTTATAGACAACATGGTA
Mv	541
BN	541
Sb	541
Sw	541
H	541
Ch	601	AACTTATTCAGGGGTTATTTTTTTTTCAGTCGGTACTATACGGGAATTTTATTATTAA
Mv	601C.....
BN	601
Sb	601
Sw	601
H	601
Ch	661	TATTACATTGATTGACCTTTAAAT
Mv	661
BN	661
Sb	661
Sw	661
H	661

Abb. 28: Nukleotidsequenzvergleich der ND4-Region von *An. claviger* s.s. der Populationen Charolais (Ch), Millevaches (Mv), Bonn (BN), Salzburg (Sb), Schwarzwald (Sw) und Holland (H)

Punkte = Übereinstimmung

In dem Alignment sind drei Mutationen zu erkennen, bei denen es sich allesamt um Transitionen handelt: Bei der Population Sw ist an Position 172 ein G-A-Austausch erkennbar, bei der Population Mv an Position 440 ebenfalls ein G-A-Austausch und an Position 631 ein C-T-Austausch.


4.2.2 Etablierung der PCR-SSCP für die CO1-Region von *An. claviger* s.s.

4.2.2.1 Amplifikation der CO1-Region

Das ursprüngliche Protokoll, welches zur Amplifikation der CO1-Region von Milben entwickelt wurde, musste für *An. claviger* s.s. modifiziert werden, um deutliche singuläre Banden zu erhalten. Dazu wurden verschiedene MgCl_2 - und Primerkonzentrationen sowie DNA-Volumina in Verdünnungsreihen durchgetestet. Es zeigte sich, dass optimale Ergebnisse mit folgendem Reaktionsansatz erhalten wurden:

10xPuffer	100mM Tris-HCl pH 8,3; 500mM KCl
MgCl_2	3mM
dNTPs	200 μM
Primer 772	200nM
Primer 773	200nM
Taq-Polymerase	2,5 Einheiten (5U/ μl)
DNA-Lösung	1 μl
dH_2O	ad 50 μl

Das Thermoprofil wurde unverändert aus NAVAJAS et al. (1994) übernommen:

Initial-Denaturierung	95 °C	4 min	 35 Zyklen
Denaturierung	92 °C	1 min	
Primer-Annealing	50 °C	1 min	
Extension	72 °C	1 min	

Bei der PCR entstanden Banden einer Länge von ca. 480 bp, die auf einem 1,5 %igen Agarosegel sichtbar gemacht wurden (Abb. 29).

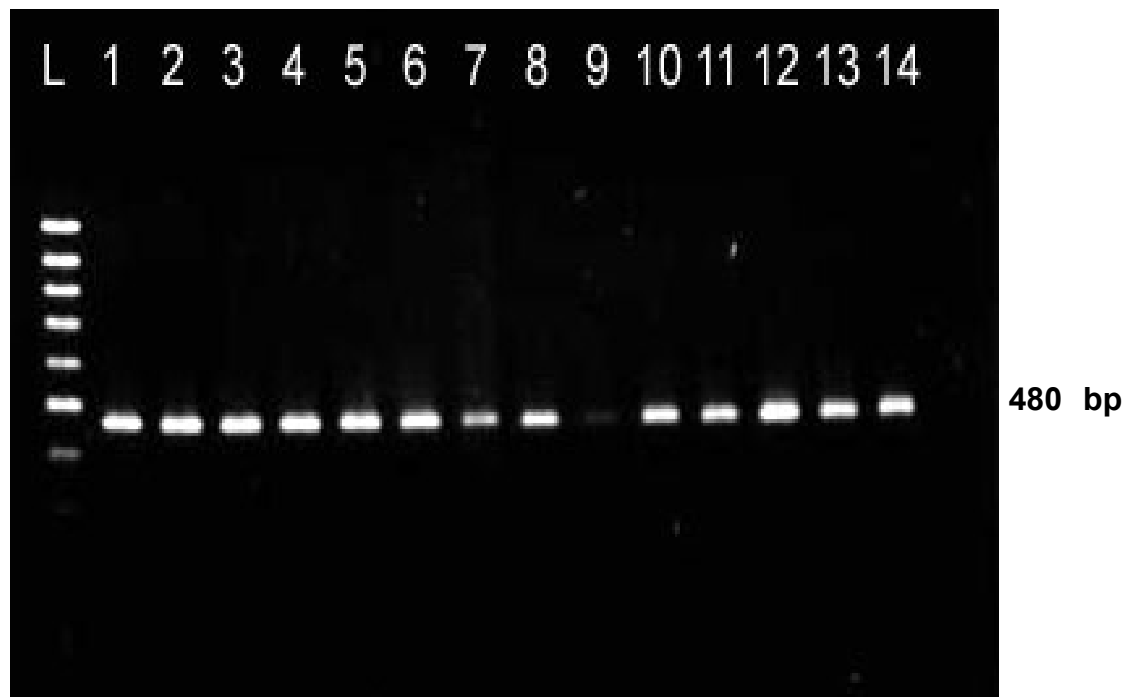


Abb. 29: Amplifikate der CO1-Region von *An. claviger* s.s.
Spuren 1-14 = BN1-14
L = 100 bp DNA-Größenmarker

4.2.2.2 Sequenzierung der CO1-Region

Da die CO1-Region eine Länge von ca. 480 bp aufwies, musste eine DNA-Restriktionsspaltung vorangeschaltet werden, um kürzere DNA-Fragmente für die SSCP-Analyse zu erhalten. Da für die Wahl eines geeigneten Restriktionsenzym die Nukleotidsequenz der CO1-Region benötigt wurde, wurden entsprechende PCR-Produkte von drei Mücken der Bonner Population sequenziert. Als Resultat entstand die in Abb. 30 gezeigte uniforme Sequenz.

772

5' -TGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTACATTTTTATTTTACCAGGATTGGAATAATTTCTCATATT
ATTACCCAAGAAAGAGGAAAAAGGAAACATTTGGAAATTTAGGAATAATTTATGCTATACTAGCAATT
GGTTTATTAGGGTTTATTGTTTGAGCCCATCAATAATTTACAGTAGGAATAGATGTAGATACTCGAGCT
TACTTTACTTCTGCTACAATAATTATTGCTGTTCCAACAGGAATTAAAATTTTAGATGATTAGCTACA
CTTCATGGAACCACTAACATACAGACCTGCTATATTATGATCATTGGAATTTGTATTTTTATTACA
GTTGGGGGATAACTGGAGTTGATAGCGTATTCTTCTTAGATATGTTTACAGAACGGATTTGGAATAATT
773
TCTCATATTATTACCCAAGAAAGAGGAAAAAGGAAACATTTGGAAATTTTATCTATAGGAGCTGTA-3'

Abb. 30: Sequenz der CO1-Region von *An. claviger* s.s. in 5'→3'-Richtung mit den flankierenden Primern 772 und 773

4.2.2.3 Restriktionsspaltung der CO1-Region

Bei Eingabe der DNA-Sequenz der CO1-Region von *An. claviger* s.s. in das Programm Webcutter 2.0 wurden für das Restriktionsenzym *ApoI* Schnittstellen angezeigt, die für die SSCP geeignete Fragmentlängen von 102, 149 und 205 Basenpaaren sowie ein weiteres, nicht zu berücksichtigendes 21 bp langes Restriktionsfragment ergaben (Abb. 31).

TGATTTTTTGGTCACCCAGAAGTTTACATTTTTATTTTACCAGGATTGGAATAATTTCTCATATTATTACCCAA
ACTAAAAACCAGTGGGTCTTCAAATGTAAAAATAAAATGGTCCTAAACCTTATTAAAGAGTATAATAATGGGTT
1

ApoI

GAAAGAGGAAAAAGGAAACATTTGGA/AATTTAGGAATAATTTATGCTATACTAGCAATTGGTTTATTAGGGTT
CTTTCTCCTTTTTTCTTTGTAAACCT/TTAAATCCTTATTAAATACGATATGATCGTTAACCAAATAATCCCAA
76

TATTGTTTGAGCCCATCAATAATTTACAGTAGGAATAGATGTAGATACTCGAGCTTACTTTACTTCTGCTACAAT
ATAACAACTCGGGTAGTTATTAAATGTCATCCTTATCTACATCTATGAGCTCGAATGAAATGAAGACGATGTTA
151

ApoI

AATTATTGCTGTTCCAACAGGAATTAA/AATTTTAGATGATTAGCTACACTTCATGGAACCTCAACTAACATACA
TTAATAACGACAAGGTTGTCCTTAATT/TTAAATCTACTAATCGATGTGAAGTACCTTGAGTTGATTGTATGT
226

GACCTGCTATATTATGATCATTTGGATTTGTATTTTTATTTACAGTTGGGGGATAACTGGAGTTGATAGCGTATT
CTGGACGATATAATACTAGTAAACCTAAACATAAAAAATAAATGTCAACCCCTATTGACCTCAACTATCGCATAA
301

CTTCTTAGATATGTTTACAGAACGGATTTGGAATAATTTCTCATATTATTACCCAAGAAAGAGGAAAAAGGAAA
GAAGAATCTATACAAATGTCTTGCCTAAACCTTATTAAAGAGTATAATAATGGGTTCTTTCTCCTTTTTTCTTTT
376

ApoI

CATTTGGA/AATTTTATCTATAGGAGCTGTA
GTAAACCT/TTAAATAGATATCCTCGACAT
451

Abb. 31: Schnittstellen in der CO1-Region von *An. claviger* s.s. durch die Restriktionsendonuklease *ApoI*

Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Restriktionsspaltung wurde empirisch ermittelt. Letztendlich wurden 1 µl *ApoI* (4000 Units/ ml) (New England Biolabs Inc.) mit 0,2 µl BSA und 2 µl des vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffers verwendet. Der Ansatz wurde mit 6,8 µl dH₂O auf 10 µl aufgefüllt. Geschnitten wurden 10 µl des PCR-Produktes.

Bei einer konstanten Temperatur von 50 °C wurden Inkubationszeiten zwischen 30 min und 10 h getestet. Bei einer Dauer von mehr als 5 h und 30 min kam es zu unspezifischen Restriktionsspaltungen, bei denen z.T. mehr Restriktionsprodukte und damit mehr Banden bei der SSCP entstanden als erwartet (vgl. Abb. 32, 34, 35). Bei einer kürzeren Inkubationszeit als 5 h 30 min waren die Banden z.T. sehr schwach und die DNA unvollständig geschnitten, d.h. es entstanden Banden, die längeren Fragmenten entsprachen als erwartet. Im Wesentlichen präsentierten sich die Restriktionsbruchstücke, die bei einer Inkubationszeit von 5 h 30 min und einer Temperatur von 37 °C entstanden, auf Agarose- und Polyacrylamidgelen als deutliche und reproduzierbare Banden, deren Laufgeschwindigkeit Fragmenten der erwarteten Länge entsprachen (Abb. 33, 36, 37).

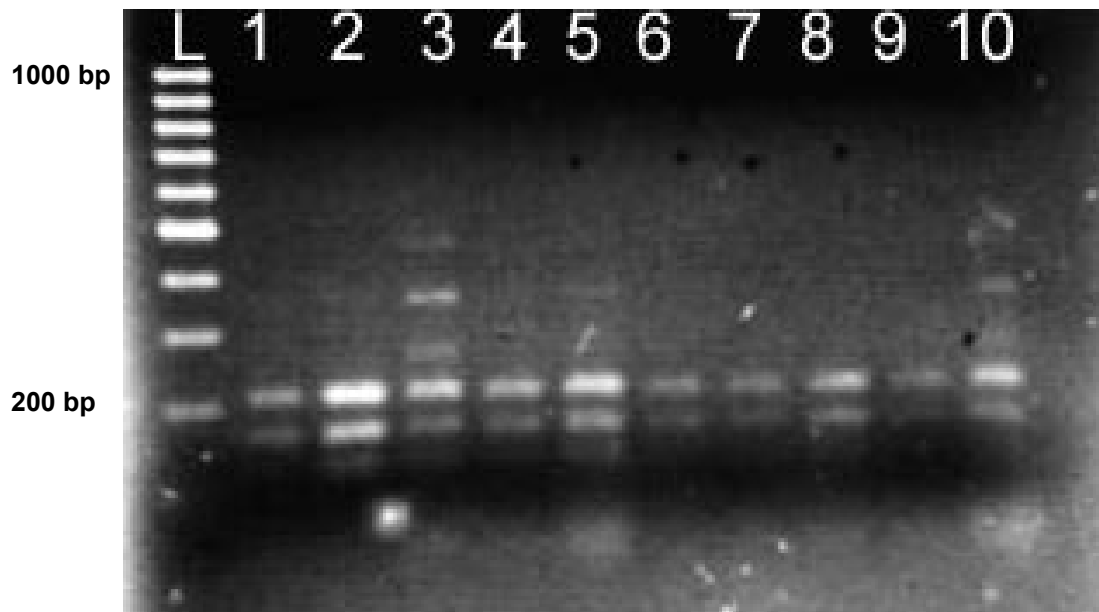


Abb. 32: Restriktion der CO1-Region von *An. claviger* s.s. mittels der Restriktionsendonuklease *ApoI* nach einer Inkubationszeit von 8 h
 Spuren 1-10 = Charolais (Ch) 1-10
 L = 100 bp Größenmarker

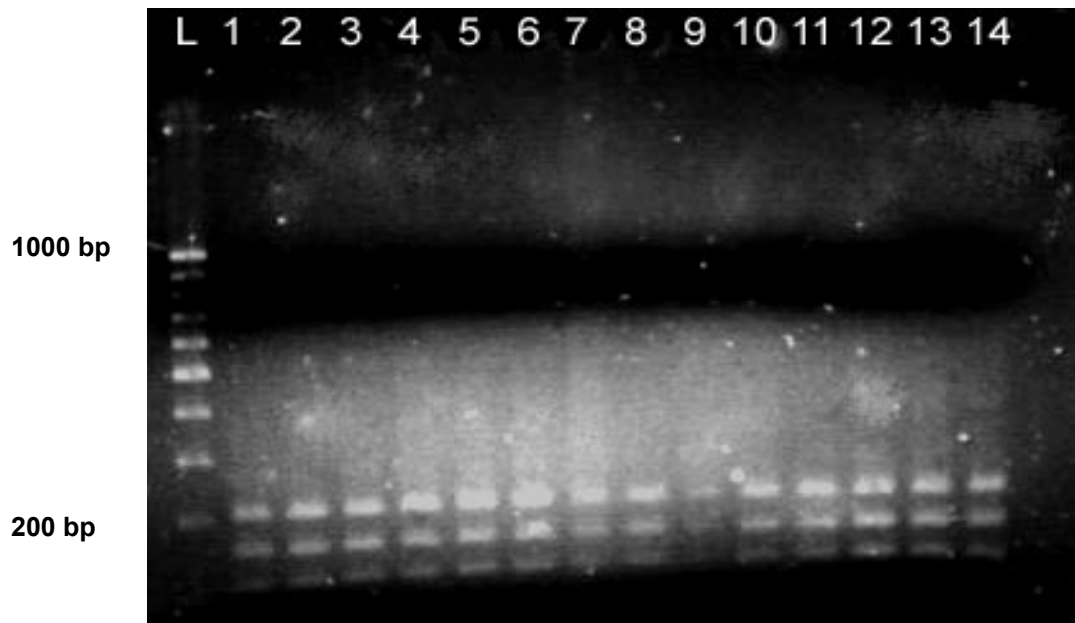


Abb. 33: Restriktion der CO1-Amplifikate von *An. claviger* s.s. mittels der Restriktionsendonuklease *Apol* nach einer Inkubationszeit von 5 h 30 min
 Spuren 1-14 = Charolais (Ch) 1-14
 L = 100 bp DNA-Größenmarker

4.2.2.4 PAGE der Spaltprodukte der CO1-Region

Für die PAGE wurde zunächst von einer Laufzeit von 4 Stunden bei 12mA Stromstärke und 4 °C Raumtemperatur ausgegangen. Es stellte sich jedoch heraus, dass einzelne Banden nach dieser Zeit bereits aus dem Gel hinausgewandert waren, so dass die Laufzeit auf 3h 30 min reduziert wurde.

Abbildungen 34 bis 37 zeigen die Entwicklung der Bandenqualität mit abnehmender Restriktionszeit. Bei diesen Gelen wurde die Laufzeit auf 3h und 30 min bei 12mA und 4 °C reduziert.

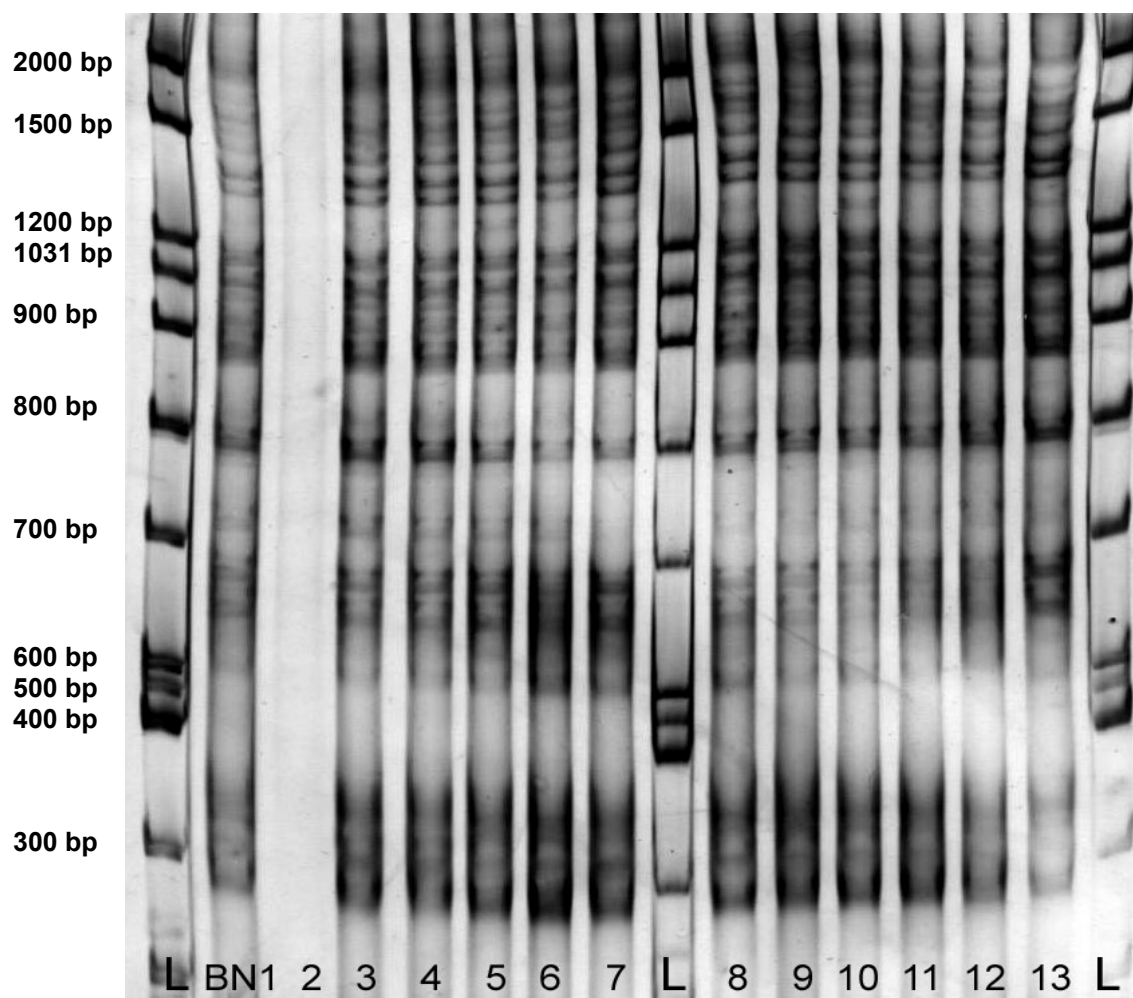


Abb. 34: PAGE der Amplifikate der CO1-Region von *An. claviger* s.s. der Population Bonn (BN) nach Restriktionsspaltung mit dem Enzym *Apol* für 10h
L = 100 bp DNA-Größenmarker Plus

In Abb. 34 ist nach einer Einwirkungszeit des Enzyms von 10 Stunden ein sehr komplexes Bandenmuster zu erkennen, welches bei unterschiedlichen Haplotypen eine eindeutige Auswertung nicht zulassen würde. Das Ziel war es aber, ein übersichtliches Muster herzustellen, bei dem eine Abweichung leicht zu beobachten sein würde.

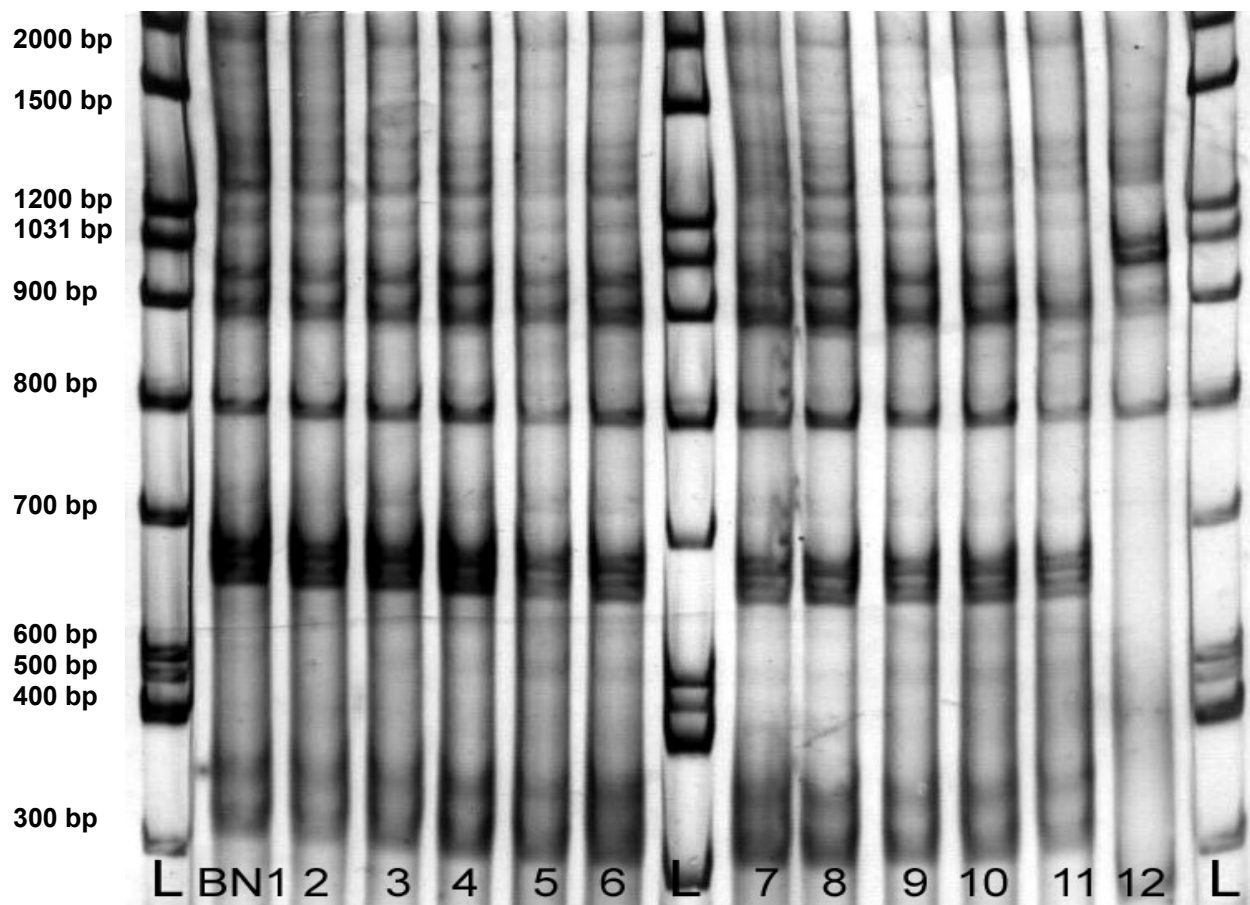


Abb. 35: PAGE der Amplifikate der CO1-Region von *An. claviger* s.s. der Population Bonn (BN) nach Restriktionsspaltung mit dem Enzym *ApoI* für 8h
 L = 100 bp DNA-Größenmarker Plus

Abbildung 35 zeigt die entsprechenden Bandenmuster mit einer deutlich reduzierten Anzahl von Banden nach einer Reaktionszeit von acht Stunden. Lediglich die Konformationen, die sich im Gel oberhalb von 1031 bp wiederfinden, können wegen der großen Anzahl eng beieinander liegender Banden nicht ausgewertet werden.

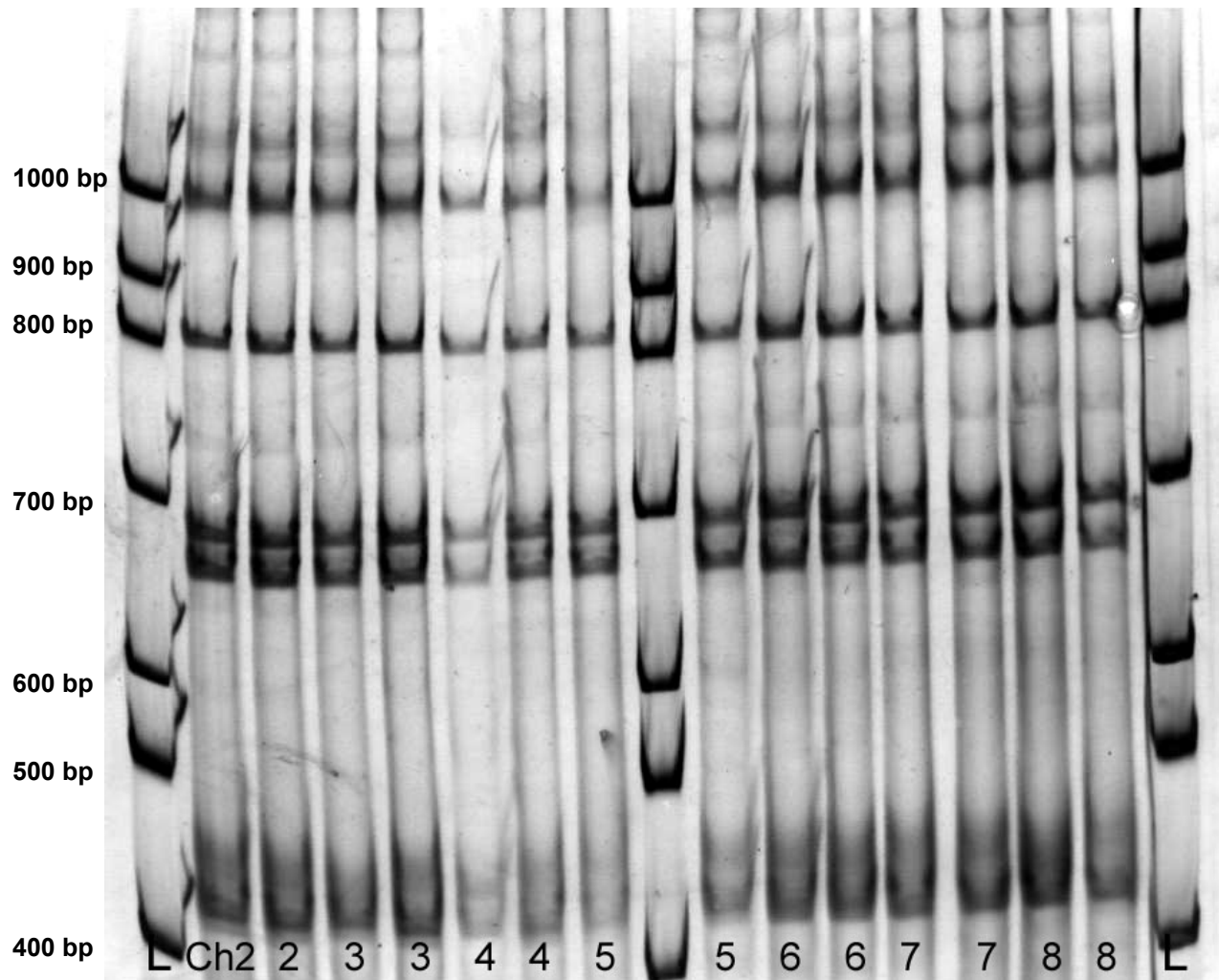


Abb. 36 PAGE der Amplifikate der CO1-Region von *An. claviger* s.s. der Population Charolais (Ch) nach Restriktionsspaltung mit dem Enzym *ApoI* für 5h bzw. 5h 30 min;
 1. Spur jeder Probe nach 5h Inkubationszeit, 2. Spur jeder Probe nach 5h 30 min Inkubationszeit
 L = 100 bp DNA-Größenmarker

Bei einer Inkubationszeit des Restriktionsansatzes von 5 Stunden bzw. 5h und 30 min zeigten sich die übersichtlichsten Bandenmuster (Abb. 36). Bei diesen Zeiten konnten die einzelnen Banden gut voneinander unterschieden werden, und die Anzahl der DNA-Fragmente, die nach der Renaturierung entstanden, entsprach der durch den Webcutter vorhergesagten (vgl. Kap. 4.2.2.3). Nach einer Inkubationszeit von 5h 30 min ist eine geringgradig höhere Intensität der Banden zu beobachten als nach einer Inkubationszeit von 5h (vgl. Abb. 36).

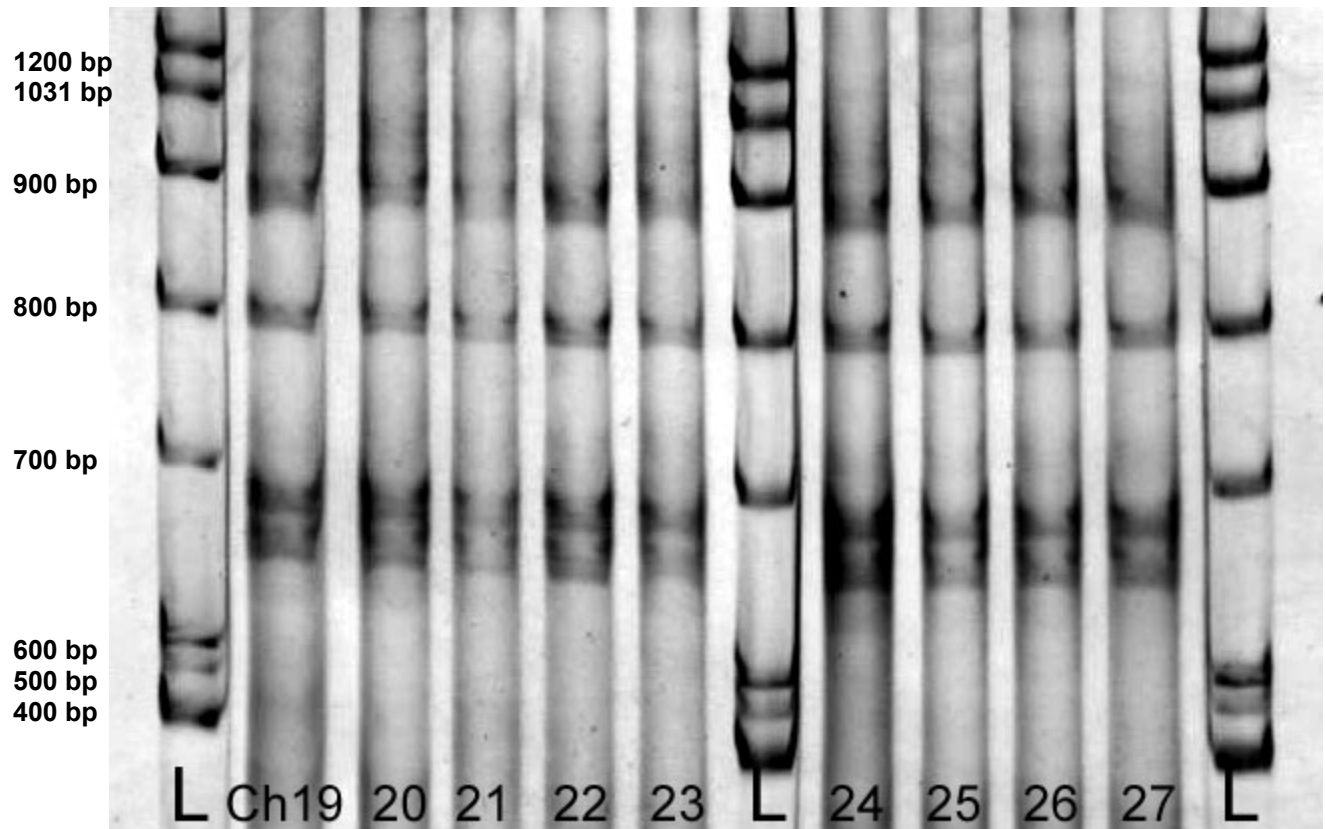


Abb. 37: PAGE der Amplifikate der CO1-Region von *An. claviger* s.s. der Population Charolais (Ch) nach Restriktionsspaltung mit dem Enzym *ApoI* für 5 h 30 min
L = 100 bp DNA-Größenmarker Plus

Eine Inkubationszeit von 5h 30 min wurde daher in den folgenden Untersuchungen bei der Spaltung verwendet und führte durchweg zu guten Ergebnissen (Abb. 37).

Zusätzlich zu den für die Etablierung der SSCP bei der CO1-Region verwendeten Proben der Populationen Charolais und Bonn, bei denen nur Stichproben untersucht wurden, wurden die 34 Individuen der Salzburger Population zweimal vollständig nach dem komplett neu erstellten Protokoll getestet. Erstaunlicherweise ergaben sich bei der Amplifikation der CO1-Region bei dieser Population keine Probleme, obwohl bei der ND4-Region trotz zahlreicher Versuche keine Amplifikate hergestellt werden konnten.

Es wurden innerhalb der CO1-Region keine unterschiedlichen Haplotypen bei der Salzburger Population nachgewiesen. Abb. 38 zeigt beispielhaft ein Gel mit 12 der untersuchten Proben, deren einheitliches Bandenmuster dem der übrigen Mücken entspricht.

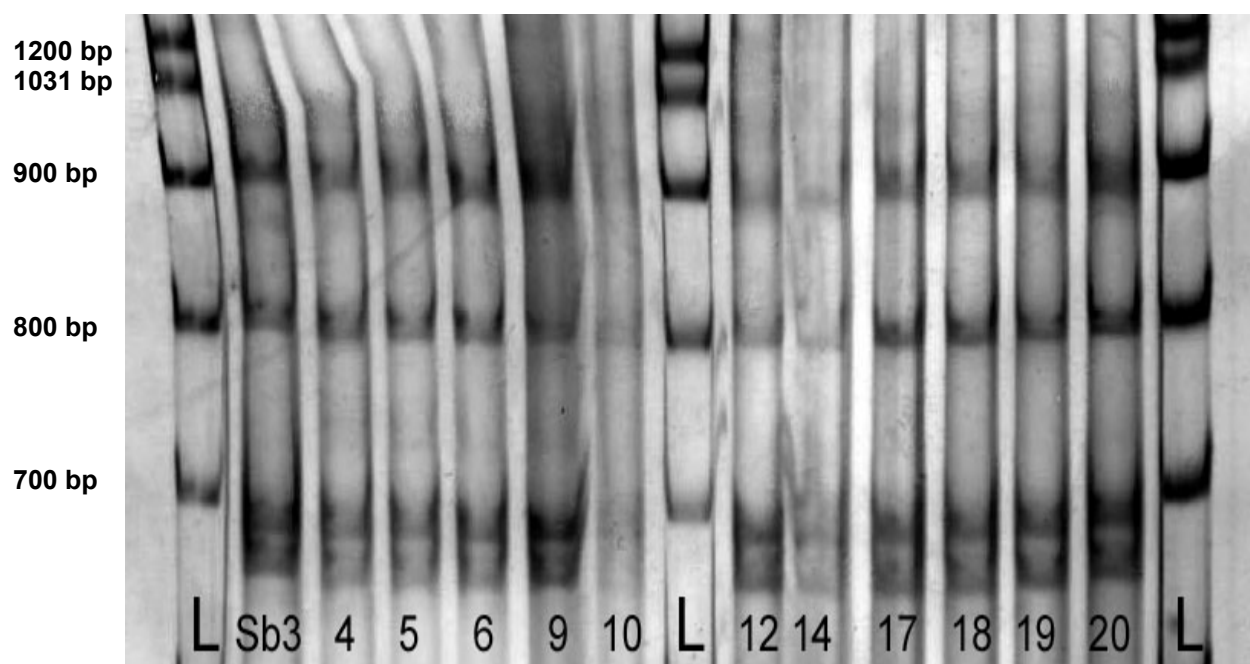


Abb. 38: PAGE der Amplifikate der CO1-Region von *An. claviger* s.s. der Population Salzburg (Sb), 1. Durchgang
L = 100bp DNA-Größenmarker Plus

5. Diskussion

Die in der Einleitung formulierte Zielsetzung der Dissertation konnte weitgehend erreicht werden. So gelang es im ersten Teil der Arbeit einen einfachen und effizienten PCR-Test zur Identifizierung der Geschwisterarten des *An. claviger* Komplexes zu etablieren. Die Evaluierung der neuen Methode an Freilandmaterial aus verschiedenen Teilen Europas und Israels brachte vollkommene Übereinstimmung mit der morphologischen Vorbestimmung.

Bei den populationsgenetischen Untersuchungen mit Hilfe der PCR-SSCP-Methode stellte sich heraus, dass die Anzahl der Polymorphismen in der vergleichend analysierten Region der mitochondrialen *An. claviger* s.s.-DNA so gering war, dass keine Rückschlüsse auf den Grad des Genflusses zwischen den Populationen gezogen werden konnten. Es konnte gezeigt werden, dass keine absolute Sicherheit besteht, mutative Veränderungen der DNA mit Hilfe der PCR-SSCP auch bei Befolgung stringenter, empfohlener Versuchsbedingungen zu entdecken. Weiterhin stellte sich heraus, dass abweichendes Laufverhalten von denaturierten PCR-Produkten im Polyacrylamidgel und DNA-Sequenzunterschiede sich nicht zwangsweise bedingen. Für die Untersuchung einer weiteren mitochondrialen DNA-Region wurden die methodischen Voraussetzungen geschaffen.

Die ITS2-Region hat sich aufgrund ihrer hohen interspezifischen und geringen intraspezifischen Variabilität als Marker zur Artdiagnostik bei vielen Arthropodengruppen bewährt, so auch zur Differenzierung von *Anopheles*-Geschwisterarten (PASKEWITZ & COLLINS 1997; BECKINGHAM 1982; WESSON et al. 1993; CRABTREE et al. 1995; CORNEL et al. 1996).

Tab. 8 zeigt eine Übersicht über die wichtigsten Charakteristika der ITS2-Region einiger *Anopheles*-Artenkomplexe. Es wird deutlich, dass die in dieser Arbeit ermittelten Längen der ITS2-Region der Geschwisterarten des *An. claviger* Komplexes im unteren Größenbereich innerhalb der Gattung *Anopheles* liegen. Im Vergleich mit anderen Culiciden, z.B. *Culex pipiens*, sind sie jedoch kürzer (SEVERINI et al. 1996; BEEBE & COOPER 2000). Mit etwas über 300 bp entsprechen sie in etwa denen der europäischen Vertreter des *An. maculipennis*-Komplexes (290-312 bp) (PROFT 2001). Der GC-Gehalt liegt bei *An. claviger* s.s. mit 56,3 % in einem Bereich, wie er bei Culiciden mit einer kürzeren ITS2-Region zu

erwarten ist. Bei *An. petragani* liegt der Anteil an GC-Basen mit 64,9 % hingegen fast 9 % höher und entspricht eher dem von Arten mit einer längeren ITS2-Region (BEEBE & COOPER 2000). Die ITS2-Regionen der beiden Geschwisterarten unterscheiden sich in 21 % der Nukleotide, wenn Substitutionen und Insertionen/Deletionen berücksichtigt werden. 9 % dieser Unterschiede gehen auf Insertionen und Deletionen zurück.

Tab. 8: Länge, Guanodin-Cytosin (GC)-Gehalt und Variabilität der ITS2-Region von verschiedenen Artkomplexen bzw. –Gruppen

Komplex	Länge [bp]	GC-Gehalt [%]	Variabilität [%]	Quelle
<i>An. maculipennis</i> -Komplex, Europa	290-312	49-54	7-25	PROFT et al. 1999
<i>An. maculipennis</i> -Komplex, Nordamerika	305-310	50-60	3,6-7,9	PORTER & COLLINS 1991
<i>An. quadrimaculatus</i> -Komplex	287-329	55,1-57,3	18,5-28,7	CORNEL et al. 1996
<i>An. gambiae</i> -Komplex	~426	~55	0,4-1,6	PASKEWITZ et al. 1993
<i>An. punctulatus</i> -Komplex	549-656	~65	nicht bekannt	BEEBE & COOPER 2000
<i>An. dirus</i> -Komplex	710-716	~55	5,4	XU & QU 1997
<i>An. nuneztovari</i> -Komplex	363-369	55,3-55,7	1	FRITZ et al. 1994

Die Unterschiede zwischen den ITS2-Nukleotidsequenzen der beiden Geschwisterarten des *An. claviger*-Komplexes waren groß genug, um speziesspezifische Primer für eine artdiagnostische PCR zu konstruieren. Die Primer AP und AC waren im Vorfeld bereits von PROFT (2001) vorgeschlagen worden. Da die Sequenzen aber nicht auf ihre Allgemeingültigkeit getestet und die Primer bisher nicht systematisch evaluiert wurden, war es notwendig, die ITS2-Regionen weiterer Mücken zu sequenzieren und die Primer hinsichtlich ihrer Funktionabilität und ihrer

Spezifität zu untersuchen. Nachdem die Sequenzen von Mücken zusätzlicher Populationen keine Abweichungen in ihren Sequenzen zeigten, wurden die Primer zur Identifizierung einer größeren Anzahl an Mücken unterschiedlicher europäischer Herkunft und aus Israel eingesetzt. Bei diesen handelte es sich sowohl um morphologisch vorbestimmte Geschwisterarten des *An. claviger*-Komplexes als auch um Spezies aus anderen Culiciden-Gattungen.

Wie die PCR-Identifizierungsergebnisse zeigen, arbeiteten die speziesspezifischen Primer unter den getesteten PCR-Konditionen optimal und führten zur Amplifikation von DNA-Fragmenten artspezifischer Länge für jede der beiden Geschwisterarten, die auf einem Agarosegel mühelos unterschieden werden konnten. Dies war sowohl der Fall, wenn eine einfache PCR mit zwei Primern (einem „forward“ und einem „reverse“ Primer) durchgeführt wurde, als auch dann, wenn der universale 5,8S-(forward) Primer im Rahmen einer Multiplex-PCR in Kombination mit beiden speziesspezifischen (reverse) Primern eingesetzt wurde. Während es zwischen den Geschwisterarten zu keiner Kreuzhybridisierung der Primer mit heterologer DNA kam, zeigte sich bei der Testung der Primer mit komplexfremder DNA überraschenderweise, dass im Genom von *An. beklemeshevi* eine Hybridisierungsstelle für den *An. petragrani*-spezifischen Primer existiert. *An. beklemeshevi*, eine Geschwisterart des europäischen *An. maculipennis*-Komplexes, ist vorwiegend in Skandinavien und Russland verbreitet (JAENSON et al. 1986; KORVENKONTIO et al. 1979; STEGNII & KABANOVA 1978) (Abb. 39), so dass mit dieser Spezies zu mindest in mittel- und südeuropäischen Mückensammlungen nicht zu rechnen ist. Nichtsdestoweniger verdeutlicht das Auftreten des PCR-Produktes, das sogar die ungefähre Länge des *An. claviger* s.s.-spezifischen Amplifikates besitzt, die Wichtigkeit der morphologischen Vorbestimmung der Mücken im Vorfeld der PCR. Bei einem Einsatz der PCR ohne vorherige Eingrenzung bis zur Komplex-Ebene würde *An. beklemeshevi* fälschlicherweise positiv als *An. petragrani* identifiziert werden, da die PCR-Produkte dieser beiden Arten wegen des minimalen Längenunterschiedes auf einem Agarosegel i.d.R. nicht differenziert werden können. Dieses Phänomen kann natürlich auch für andere, in dieser Arbeit nicht getestete *Anopheles*-Spezies nicht ausgeschlossen werden.



Abb. 39: Fundorte von *An. beklemeshevi* (RAMSDALE & SNOW 2000)

Zur Identifizierung von Mücken-Wildfängen des *An. claviger*-Komplexes wurde die PCR jedoch erfolgreich eingesetzt. Bei nahezu allen getesteten Individuen entstand eine singuläre, klare Bande auf dem Agarosegel, die aufgrund ihrer spezifischen Länge unzweifelhaft entweder als *An. claviger* s.s. oder *An. petragani* identifiziert werden konnte.

Mangelhafte Qualität der für die artdiagnostische PCR verwendeten DNA stellte sich als Ursache für das völlige Ausbleiben von Amplifikaten bei 12 Bonner Individuen heraus: Auch mit den Primern 5,8S und 28S konnte bei diesen Mücken keine DNA-Amplifikation der gesamten ITS2-Region erreicht werden. Im Allgemeinen geht man davon aus, dass *An. claviger* s.s. in Europa, Nordafrika und dem Nahen Osten verbreitet ist. *An. petragani* hingegen soll nur im westlichen mediterranen Raum vorkommen (CIANCHI et al. 1981; BULLINI 1984). Da in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen wurde, dass *An. claviger* s.s. in verschiedenen Ländern Europas sowie in Israel (als Vertreter für ein Land des Nahen Ostens) und *An. petragani* bisher nur

in Südfrankreich und Spanien vorkommen, werden die Ergebnisse älterer Studien, in denen andere Identifizierungsmethoden verwendet worden waren (POSTIGLIONE et al. 1972, RAMSDALE & SNOW 2000), bestätigt. Dennoch sind neuere Daten zur Verbreitung der Geschwisterarten des *An. claviger*-Komplexes dringend erforderlich, da sich ihre Verbreitungsgebiete in Anpassung an Umweltveränderungen ebenso verschieben können wie die der von ihnen potenziell übertragbaren Krankheitserreger.

Die in dieser Arbeit ausgewählten *An. claviger* s.s.-Populationen sollten anhand ihrer genetischen Homogenität bzw. Variabilität auf einen Genfluss untersucht werden. Der Genfluss ist ein Maß dafür, inwieweit jede Population eine unabhängige evolutionäre Einheit darstellt, in der ein Gleichgewicht nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz vorliegt (SLATKIN 1993). Wie in anderen Studien (KAMBHAMPATI et al. 1992, CHARLWOOD 1996, LEHMANN et al. 1998, De MERIDA et al. 1999, KAMAU et al. 1999, SIMARD et al. 1999, TAYLOR et al. 2000, TRIPET et al. 2001) sollten genetische Unterschiede, soweit vorhanden, mit den in diesen Regionen vorkommenden geographischen Gegebenheiten in Verbindung gesetzt werden. Flüsse, große Seen oder Gebirgsketten zwischen Populationen sind als Ursachen für die fortschreitende Isolierung einer Population in Betracht zu ziehen. Weiterhin können genetische Varianz und geographische Distanz möglicherweise in Beziehung zueinander gesetzt werden. Ein homogener Genpool trotz einer großen Entfernung könnte – wie Untersuchungen an *Aedes albopictus*-Populationen zeigten (KAMBHAMPATI & RAI 1992) – seine Ursache z.B. in einer Verschleppung von Individuen, z.B. durch den Handel mit Autoreifen oder einer Verbreitung durch Winde haben. Auf diese Weise kann es auch über große geographische Distanzen hinweg zu einer Vermischung des Genpools kommen, was die Ausbreitung von bestimmten Merkmalen zur Folge haben kann.

Sowohl mitochondriale als auch ribosomale DNA-Regionen, die üblicherweise als Grundlage für den Nachweis eines Genflusses verwendet werden, weisen in Bezug auf ihre Evolutionsgeschwindigkeit und die daraus resultierende Variabilität bei verschiedenen Arten (so auch bei Geschwisterarten innerhalb eines Artenkomplexes) erhebliche Unterschiede auf (NAVAJAS et al. 1998, PROFT 2001). Eine Voraussage darüber, ob eine bestimmte DNA-Region bei einer gegebenen Spezies eine niedrige oder eine hohe Anzahl an Polymorphismen besitzt, ist daher kaum möglich. So zeigt z.B. die ITS2-Region bei *An. nuneztovari* (FRITZ et al. 1994),

den zwei Zeckenarten *Ixodes scapularis* und *I. pacificus* (McLAIN et al. 1995) und den fünf Spezies der *Drosophila melanogaster*-Gruppe (SCHLÖTTERER et al. 1994) eine äußerst geringe intraspezifische Variabilität. Untersuchungen an *Aedes aegypti* und *Ae. simpsoni* (WESSON et al. 1992), 14 nordamerikanischen *Simulium*-Arten (TANG et al. 1996) und dem Cicindeliden *Cicindela dorsalis* (VOGLER & De SALLE 1994) ergaben hingegen eine beachtliche interindividuelle Heterogenität der ITS2-Region. Nichtsdestoweniger ist nach DESPRES et al. (1992) und CAPORALE et al. (1995) davon auszugehen, dass mtDNA erheblich schneller evolviert als rDNA und damit für einen intraspezifischen Vergleich vorzuziehen wäre. Fehlende Variabilität zwischen verschiedenen Populationen einer Spezies ist aber nicht uneingeschränkt mit regelmäßigem genetischem Austausch gleichzusetzen. NAGYLAKI (1975) wies z.B. darauf hin, dass Selektion, die in verschiedenen Populationen gleiche Allele bevorzugt, natürlich auch zu einem homogenen Genpool führen kann, ohne dass überhaupt ein Genfluss zwischen den Populationen besteht.

Für die Untersuchung einer großen Anzahl von Individuen auf mutative Veränderungen, wie es für populationsgenetische Studien notwendig ist, ist die SSCP im Gegensatz zur DNA-Sequenzierung weit weniger zeit- und kostenaufwendig (GASSER 1997). Abweichende Genotypen können bereits im Vorfeld selektiert und anschließend sequenziert werden. So wurde die PCR-SSCP mit großem Erfolg als Screening-Methode zur Detektion von Mutationen und Polymorphismen und somit zur Differenzierung von Haplotypen auf der Basis mitochondrialer DNA-Bereiche verwendet (z.B. HAYASHI 1991, PROFT 2001, SHARPE et al. 1999, De MERIDA et al. 1999). Essentielle Voraussetzung für aussagekräftige und reproduzierbare Ergebnisse ist allerdings ein optimiertes Versuchsprotokoll. Hierzu gehören zunächst ideale Amplifikationsbedingungen mit hochspezifischen Primern. Um DNA-Fragmente einer für die SSCP-Analyse geeigneten Länge zu erhalten, muss ein entsprechendes Restriktionsenzym gefunden werden. Voraussetzung hierfür sind Kenntnisse zur DNA-Sequenz des Amplifikates bzw. zur Existenz und Verteilung möglicher Schnittstellen. Die Restriktionsendonuklease sollte die amplifizierte DNA in Fragmente schneiden, die einerseits so kurz sind, dass eine möglichst hohe Sensitivität zur Detektion von Polymorphismen gewährleistet ist, die andererseits aber nicht so zahlreich sind, dass sie nach gelelektrophoretischer Auftrennung zu einem unübersichtlichen Bandenmuster führen. Für die PAGE sind besonders Umgebungstemperatur,

Laufzeit und Spannung sowie Konzentration des Laufpuffers von großer Bedeutung. Schließlich stellt die Silberfärbung eine oft nicht zu beeinflussende Variable dar, die der Grund für vermeintlich abweichende Bandenmuster sein kann: Je nach Verweildauer der Gele im Färbebad bzw. Entwicklungsdauer können zusätzliche Banden auftreten oder Banden fehlen, wenn geringere Mengen an DNA in ihnen enthalten sind. Für die Qualität des Gels und seine Interpretation spielt natürlich auch die Intensität der Hintergrundfärbung eine ausschlaggebende Rolle (BLUM et al. 1987, KAMPEN 1994).

Unterschiedliche Bandenmuster bei unabhängig voneinander durchgeführten Untersuchungen gleicher Individuen, wie mehrfach in dieser Arbeit vorgekommen, können darüber hinaus noch weitere Ursachen haben. ORITA et al. (1989a) und HAYASHI (1991) postulierten, dass eine bestimmte einzelsträngige DNA je nach den äußeren Umständen (z.B. Temperatur) mindestens zwei verschiedene molekulare Formen und damit stabile Konformationen annehmen kann. Treten verwaschene Banden im Gel auf, kann das daran liegen, dass zwei oder mehrere Konformitätsstadien vorliegen, deren zugehörige Banden sich elektrophoretisch nicht klar voneinander trennen lassen. Aus diesem Grund ist mindestens eine Wiederholung der gesamten Versuchsabfolge, angefangen bei der PCR, erforderlich. Als Ursache für abweichende Bandenmuster wären schließlich auch während der PCR-Amplifikation durch die Taq-Polymerase falsch eingebaute Nukleotide denkbar (HAYASHI 1991), wodurch Punktmutationen in der DNA des untersuchten Organismus vorgetäuscht werden. Sollten in dieser zweiten Untersuchungsreihe andere Bandenmuster als im ersten Versuchablauf auftreten, müssen weitere Tests zeigen, ob die Variationen Artefakte darstellen oder tatsächlich auf Mutation zurückzuführen sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde die ND4-Region der mitochondrialen DNA als genetischer Marker für Vergleichsanalysen zwischen Populationen von *An. claviger* s.s. verwendet. Da die ND4-Region bei *An. claviger* s.s. eine Länge von etwa 700 bp aufweist, wurde sie mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *DraI* in kleinere Fragmente zerschnitten. Den Angaben von HAYASHI (1991) und GASSER (1997) zufolge sollte bei der damit vorgegebenen Fragmentlänge der Nachweis von Punktmutationen im Rahmen einer PCR-SSCP-Analyse mit hoher Sensitivität gelingen, wobei aufgrund der geringen Anzahl der DNA-Bruchstücke auch übersichtliche Bandenmuster zu erwarten waren.

Übersichtliche Bandenmuster kamen in den dargestellten Versuchen zwar in aller Regel zustande, doch waren reproduzierbare Abweichungen, die auf interindividuelle Sequenzvariationen hindeuteten, höchst selten. Im Verlaufe der Untersuchungen traten bei 34 von 377 untersuchten Individuen Abweichungen im Bandenmuster – im Vergleich zu den jeweils anderen auf dem Gel dargestellten Individuen – auf. Diese waren jedoch nur bei der Mücke Ch5 reproduzierbar. Nichtsdestoweniger kann Ch5 nicht als eigenständiger Haplotyp angesehen werden, da die Abweichung im Bandenmuster bei der anschließenden Sequenzierung nicht als Mutation verifiziert werden konnte. Die Sequenzierung der übrigen 33 ND4-Fragmente erbrachte in drei Fällen den Beleg eines Nukleotidaustausches, obwohl hierbei Abweichungen in der PAGE nicht reproduzierbar auftraten. Im Gegensatz dazu wurde aber auch in einer Mücke, die in der PCR-SSCP vollkommen unauffällig blieb, mittels DNA-Sequenzierung eine Transition entdeckt. Dieser Befund deutet darauf hin, dass sich die Konformationen, die die denaturierten DNA-Stränge einnahmen, durch die Mutation nicht geändert hatten. Wie aber bereits SHEFFIELD und Kollegen (1993) konstatierten, können unterschiedliche Nukleotide an gleicher Stelle des DNA-Stranges durchaus gleiche Resultate in der PAGE liefern. Die Autoren berichteten weiterhin, dass sie keine Unterschiede in der Sensitivität des Nachweises von Transitionen oder Transversionen feststellen konnten. Die Art der Mutation ist demzufolge in der vorliegenden Untersuchung vermutlich nicht die Ursache dafür, dass die Punktmutationen bei der SSCP unentdeckt geblieben sind.

Die Tatsache, dass in der mitochondrialen ND4-Region offenbar nur zwei (in der PCR-SSCP unauffällige) Haplotypen auftraten, könnte darauf hindeuten, dass diese DNA-Region innerhalb der Spezies *An. claviger* s.s. nicht oder nur geringfügig polymorph ist. Möglicherweise wären allerdings bei der Wahl anderer genetischer Marker weitere Haplotypen aufgetreten, die hier verdeckt blieben. SCHAFFNER et al. (2000) konnten nämlich im Rahmen von isoenzymelektrophoretischen Untersuchungen an *An. claviger* s.s., die z.T. denselben Populationen wie in dieser Arbeit entstammten, zwei Gruppen differenzieren: Gruppe I repräsentierte Individuen, die aus westlichen und zentralen Sammelgebieten Frankreichs stammten, Gruppe II repräsentierte östliche Fanggebiete, zu denen östliche Teile Frankreichs und Populationen aus der Schweiz und Deutschland gehörten. Zwischen diesen Gruppen ermittelte SCHAFFNER einen signifikanten $F_{st}/1-F_{st}$ Wert. Mit diesem Wert wird die sog. „isolation by distance“, wie sie von WRIGHT (1943) beschrieben wird,

dargestellt. Die genetische Differenzierung von Individuen wird hierbei als eine Funktion der geographischen Distanz, sei es durch Entfernung oder durch eine geographische Barriere, angegeben (vgl. auch DONNELLY et al. 2002). Zwischen den oben genannten Gruppen stellte SCHAFFNER keinen Trend zur Isolation aufgrund von Entfernung fest. Innerhalb jeweils einer dieser Gruppen stellten sich die Proben der verschiedenen Populationen als sehr homogen dar. SCHAFFNER erklärt die divergierenden genetischen Gruppen mit ihrer unterschiedlichen Ökologie, die auch in unterschiedlichem Verhalten in den östlichen und westlichen Regionen zum Ausdruck kommen und zu einer genetischen Isolierung führen kann. Für bzw. gegen eine Isolierung konnte SCHAFFNER jedoch keinen Beweis erbringen, weshalb er molekularbiologische Untersuchungen an mitochondrialer und Mikrosatelliten-DNA empfahl. Nach den Ergebnissen von SCHAFFNER konnte also in der vorliegenden Arbeit durchaus davon ausgegangen werden, mittels PCR-SSCP entsprechende Ergebnisse bei den Populationen, die zu einer der beiden oben genannten Gruppen gehören, zu finden.

Eine weitere Verkürzung der ND4-Bruchstücke könnte möglicherweise ebenfalls zu einer Erhöhung der Sensitivität der SSCP führen. Zwangsweise würden hierdurch allerdings auch mehr Banden und unübersichtlichere Bandenmuster entstehen. Legt man jedoch die Homogenität der in dieser Arbeit ermittelten DNA-Sequenzen der ND4-Region zugrunde, so ist eher davon auszugehen, dass diese Region generell für populationsgenetische Untersuchungen an *An. claviger* s.s. nicht variabel genug ist. Für weitere Untersuchungen sollte daher auf andere Regionen der mtDNA, wie die ND5- oder die 16S-Region (De MERIDA et al. 1999), oder die CO1-Region zurückgegriffen werden.

Die CO1-Region, an der in vergleichbaren Studien bereits wertvolle Ergebnisse im Hinblick auf die inter- und intraspezifische genetische Divergenz verschiedener Populationen erbracht wurden (AVISE et al. 1987; NAVAJAS et al. 1994, 1996, 1998; FOURNIER et al. 1994, SALOMONE et al. 1996, SCHÖLER 2003) sollte in dieser Arbeit weiter Aufschlüsse erbringen. In den Untersuchungen von NAVAJAS et al. (1994), in denen verschiedene Milben-Spezies verglichen wurden, ergab ein Abschnitt der CO1-Region z.B. Nukleotidunterschiede von 5-25 %. WALTON et al. (2000) konnten durch vergleichende Untersuchungen eines Fragmentes der CO1-Region von drei Spezies aus dem *An. dirus*-Komplex genau demonstrieren, ob

zwischen verschiedenen Populationen dieser z.T. sympatrisch vorkommenden Arten ein Genfluss bestand oder nicht. LUNT et al. (1996) verglichen die CO1-Region verschiedener Insektenarten (inklusive *An. gambiae* s.s. und *An. quadrimaculatus* Spezies A) und stellten ähnliche Variabilitätswerte in den einander entsprechenden Abschnitten der CO1-Region fest. SALLUM et al. (2002) nutzten schließlich einen Teil der CO1-Region, um phylogenetische Verwandtschaftsverhältnisse von 32 Mückenarten der Unterfamilie Anophelinae zu erforschen.

Doch auch die Ergebnisse der biochemischen Analyse des CO1-Genproduktes trugen dazu bei, die Region als prinzipiell geeignet für populationsgenetische Studien zu erachten. Mutationsanalysen in den für die reaktiven Zentren kodierenden Nukleotidsequenzen des entsprechenden Proteins lassen Rückschlüsse von Sequenzvariationen auf die Genfunktion zu (GENNIS 1992). Außerdem dominieren die hochkonservierten Aminosäurereste in den Reaktionszentren des Proteins nicht das gesamte CO1-Molekül, sondern lassen Raum für variable Abschnitte (LUNT et al. 1996). Diese Kombination aus konservierten und variablen Regionen macht die CO1-Region so attraktiv für populationsgenetische Untersuchungen.

So sollte es noch Inhalt dieser Arbeit sein, die methodischen Grundlagen zur populationsgenetischen Untersuchung von *An. claviger* s.s. mittels PCR-SSCP der CO1-Region zu schaffen. Die PCR-Amplifikation eines Abschnittes der CO1-Region, die mit Hilfe der bereits bei Milben (*Tetranychidae*) evaluierten Primer 772 und 773 (NAVAJAS et al. 1994) erfolgte, erbrachte auch bei *An. claviger* s.s. saubere und hochkonzentrierte PCR-Produkte. Die Primer wurden letztendlich gewählt, weil die Größe der Amplifikate nach der Restriktionsspaltung eine übersichtliche Anzahl von Bruchstücken mit geeigneter Länge für die SSCP-Analyse versprach. Die Restriktionsspaltung mit der Restriktionsendonuklease *ApoI* verlief erwartungsgemäß und lieferte drei saubere DNA-Fragmente in einem Längenbereich bis etwa 200 bp, so dass man von einer Sensitivität im Aufzeigen von Polymorphismen von bis zu 99 % ausgehen konnte (HAYASHI 1991).

Für die Versuchsbedingungen bei der PAGE stellte sich heraus, dass die Laufzeit – im Vergleich zu den Untersuchungen an der ND4-Region – um eine halbe Stunde, auf 3h 30 min, reduziert werden musste. Die Stromstärke von 12mA und die Raumtemperatur von 4 °C erwiesen sich jedoch auch bei der CO1-Region als geeignete Parameter für den Erhalt sauberer und auswertbarer Bandenmuster. Die SSCP-Analyse von 34 Individuen derselben Population erbrachte weder

interindividuelle Abweichungen in den Bandenmustern noch in den DNA-Sequenzen. Interessanterweise gehörten die untersuchten Mücken zur Salzburg-Population, bei der es zuvor nicht möglich gewesen war, die gesamte ND4-Region mit dem Primerpaar ND4ar/ND4c zu amplifizieren, wohl aber die ND4-Teilregionen mit den Primerpaaren ND4ar/ND4c₂ und ND4c/ND4ar₂. Eine unzureichende Konservierung des Materials kann also nicht als Ursache in Betracht gezogen werden. An den ungleichen Ergebnissen, die mit der Salzburger Population gewonnen wurden, zeigt sich jedoch, wie wichtig der kombinierte Einsatz mehrerer genetischer Marker ist. Neben den einleitend erwähnten Studien zur CO1-Region von Anophelinen (BEARD et al. 1993; WALTON et al. 2000; SALLUM et al. 2002) sind auch ein Genbank-Eintrag (Zugangs-Nr. AF253042) und eine Literaturerwähnung für *An. claviger* s.s. zu finden (REY et al. 2001). Die eigene Teilsequenz der CO1-Region ist kürzer und befindet sich etwa mittig in der von REY et al. (2001) ermittelten. Im Alignment sind weitgehende Übereinstimmungen in der Nukleotidabfolge festzustellen. Bei beiden Sequenzen handelt es sich allerdings lediglich um Fragmente der CO1-Region. Deren komplette Länge ist von *An. gambiae* s.s. (BEARD et al. 1993) und *An. quadrimaculatus* (COCKBURN et al. 1990) bekannt und beträgt ca. 1500 bp. Wie ein Vergleich der *An. claviger* s.s.- mit der *An. gambiae* s.s.- und der *An. quadrimaculatus*-Sequenz zeigt, umfasst erstere ungefähr das mittlere Drittel der gesamten CO1-Region. Weitere Untersuchungen mit Hilfe der PCR-SSCP und DNA-Sequenzierungen müssen zeigen, ob die CO1-Region eine ausreichende Variabilität für populationsgenetische Studien an *An. claviger* s.s. aufweist.

6 Zusammenfassung

Zur Unterscheidung der Geschwisterarten des *Anopheles claviger*-Komplexes, *An. claviger* s.s. und *An. petragrani*, wurde ein auf der PCR basierendes diagnostisches Verfahren entwickelt. Unterschiede in der Nukleotidsequenz der ITS2-Regionen der ribosomalen DNA wurden dazu verwendet, speziesspezifische Primer herzustellen, deren Amplifikate allein anhand ihrer Länge einer der beiden Geschwisterarten zugeordnet werden können. Bei der Evaluierung der Methode wurden 580 von 592 Freilandmücken von *An. claviger* s.l. eindeutig als jeweils eine der beiden Arten identifiziert. Bei den verbleibenden 12 Mücken konnte aufgrund unzureichender DNA-Qualität überhaupt kein PCR-Produkt erhalten werden. Von den 592 Individuen waren im Vorfeld bereits 407 im Larven- und Puppenstadium morphologisch identifiziert worden. Die Ergebnisse der diagnostischen PCR stimmten in allen Fällen mit denen der morphologischen Identifizierung überein. Die als *An. claviger* s.s. identifizierten Mücken stammten aus 26 Populationen aus ganz Europa und einer Population aus Israel. Mücken, die als *An. petragrani* identifiziert wurden, wurden in Südfrankreich und Spanien gesammelt.

Zur populationsgenetischen Analyse von *An. claviger* s.s. wurde die PCR-SSCP-Methode eingesetzt. Es wurden 31 Populationen mit insgesamt 377 Individuen untersucht. Von sechs dieser Populationen wurden jeweils mehr als 25 Mücken getestet, von den anderen 25 Populationen mindestens fünf Individuen. Zur Differenzierung zwischen und innerhalb von Populationen wurde das Gen der Untereinheit 4 der NADH-Dehydrogenase (ND4-Region) der mtDNA ausgewählt, die sich bei vergleichbaren Studien bewährt hatte. Da das aus dieser Region amplifizierte PCR-Produkt mit annähernd 700 bp zu groß für die SSCP-Analyse war, wurde es mit dem Restriktionsenzym *DraI* in kleinere Fragmente zerschnitten. Diese wurden denaturiert und durch eine PAGE aufgetrennt. Die entstandenen Bandenmuster wurden sowohl zwischen Individuen derselben Population als auch verschiedener Populationen verglichen. Von 34 Individuen, die in ihrem Bandenmuster vom uniformen Gros der Mücken abwichen, wurde der Vorgang von DNA-Amplifikation, Restriktionsspaltung und gelelektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte je mindestens zweimal wiederholt. Bei lediglich zwei Individuen waren die Abweichungen reproduzierbar. Von diesen zweien mit wiederholt abweichenden Bandenmustern und weiteren je drei willkürlich ausgewählten Individuen aller sechs

Populationen mit mehr als 25 Mücken wurden die PCR-Produkte sequenziert. Bei zwei Mücken aus verschiedenen Populationen wurden auf diese Weise jeweils eine Punktmutation (Transition) nachgewiesen, die bei der SSCP nicht als eigenständige Haplotypen aufgefallen waren. Die zwei bei der PCR-SSCP aufgefallenen Individuen mit abweichenden Bandenmustern zeigten hingegen keine divergierende Nukleotidsequenz. Die erwartete Sensitivität der PCR-SSCP-Methode konnte für die gewählte DNA-Region daher experimentell nicht bestätigt werden. Aufgrund der geringen Anzahl von DNA-Polymorphismen war keine populationsgenetische Auswertung möglich.

In der Erwartung auf eine größere genetische Variabilität wurde die PCR-SSCP darüber hinaus am Beispiel einer einzelnen Population aus 34 Mücken für das Gen der Untereinheit 1 der mitochondrialen Cytochrom-Oxidase (CO1) etabliert. Das PCR-Produkt dieser Region hat eine Länge von 477 bp und wurde zur SSCP-Analyse mit der Restriktionsendonuklease *ApoI* in vier Fragmente geschnitten. Innerhalb dieser Population waren keine Unterschiede in den individuellen Bandenmustern festzustellen.

7 Summary

A PCR-based diagnostic assay was developed that rapidly and reliably differentiates the sibling species of the *Anopheles claviger* complex, *An. claviger* s.s. and *An. petragrani*. The assay used nucleotide differences in the ITS2 ribosomal DNA to generate PCR products of specific length for each of the two species. Evaluating the test, 580 out of 592 field-collected *An. claviger* s.l. specimens were unambiguously identified as one of the two sibling species. Due to poor DNA quality the remaining 12 specimens yielded no PCR product at all. 407 larval specimens of the 592 mosquitoes, had been identified morphologically prior to species-specific DNA amplification, and in all instances PCR identification corroborated with morphological identification. Mosquitoes identified as *An. claviger* s.s. derived from various localities spread all over Europe and from Israel. Those identified as *An. petragrani* were collected in southern France and Spain.

The PCR-SSCP-method was employed for the population genetic analysis of *An. claviger* s.s.. 31 populations consisting of a total of 377 individuals were examined. In six populations more than twenty-five mosquitoes each were tested, and at least five individuals in each of the other populations. In order to differentiate between and within the populations the gene coding for subunit 4 of the NADH-dehydrogenase (ND4-region) of the mtDNA was used. It had been shown to be appropriate in comparable studies. The PCR product amplified from this region was approximately 700 bp in length. Being too large for the SSCP-analysis it was restricted by the endonuclease *DraI* to obtain smaller DNA-fragments. These were denatured and separated by PAGE. The resulting banding patterns were then compared between individuals of the same population as well as between individuals of different populations. In 34 specimens the fragment pattern differed from the uniform rest of the mosquitoes. Repeating the experimental process of DNA amplification, restriction and gel electrophoretic separation of the PCR product at least twice the variation was reproducible in two cases only. Sequence analysis of the PCR products was performed for these two cases and three randomly picked individuals out of each of the six populations with more than 25 individuals. Two mosquitoes of different populations exhibited a point mutation (transition) which had not been detected by the SSCP method. On the other hand, two mosquitoes with diverging banding patterns in the PAGE did not differ in their nucleotide sequences. In conclusion DNA

polymorphisms in the selected gene sequences was too small to be used for population genetic analyses by PCR-SSCP.

Alternatively the PCR-SSCP was established for the gene coding for subunit 1 of the mitochondrial cytochrome-oxidase (CO1 region) for a single population comprising 34 mosquitoes. The PCR product had a length of 477 bp and was digested by the restriction endonuclease *ApoI* to four fragments of adequate length for the SSCP analysis. Comparing the banding patterns within this population no individual variability was detected.

8 Literatur

- 1.) ADAMOVICH V.L., STRUTINSKII V.M. (1974).
The importance of adults of *Aedes cinereus* Meig. as mechanical carriers of tularaemia in forest-marsh landscapes [Russisch].
Probl. Os. Opasn. Infekt., **1**, 100-108
- 2.) ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J.D. (1990).
Molekularbiologie der Zelle.
2. Auflage, VCH, Weinheim, Basel, Cambridge, New York, S. 218
- 3.) ARTEMENKO L.P., PONOMARENKO V. YA. (1974).
A study of the agent of anaplasmosis of cattle in mosquitoes [Russisch].
Veterinariya, **37**, 88-90
- 4.) AVISE J.C. (1986).
Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals.
Phil. Trans. Roy. Soc., **312**, 325-342
- 5.) AVISE J.C., ARNOLD J., BALL R.M., BERMINGHAM E., LAMB T., NEIGEL J.E., REEB C.A., SAUNDERS N.C. (1987).
Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics.
Am. Rev. Ecol. Syst., **18**, 489-522
- 6.) BASTIAN S. (2000).
Untersuchungen zur *Anopheles*-Fauna in Bonn mit besonderer Berücksichtigung der Identifizierung und Charakterisierung von *Anopheles*-Brutgewässern.
Diplomarbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- 7.) BATES M., HACKETT L.W. (1939).
The distinguishing characters of the population of the *An. maculipennis* found in southern Europe.
Proc. Int. Congr. Ent., **3**, 1555-1569
- 8.) BEARD C.B., MILLS HAMM D., COLLINS F.H. (1993).
The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects.
Insect Mol. Biol., **2**, 103-124
- 9.) BECKINGHAM K. (1982).
Insect rDNA.
Cell Nucl., **10**, 205-269

- 10.) BEEBE N.W., SAUL A. (1995).
Discrimination of all members of the *Anopheles punctulatus* complex by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis.
Am. J. Trop. Med. Hyg., **53**, 478-481
- 11.) BEEBE N.W., COOPER R.D. (2000).
Systematics of malaria vectors with particular reference to the *Anopheles punctulatus* group.
Int. J. Parasitol., **27**, 1061-1064
- 12.) BLACK W.C. (1993).
PCR with arbitrary primers: approach with care.
Insect Mol. Biol., **2**, 1-6
- 13.) BLUM H., BEIER H., GROSS H.J. (1987).
Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels.
Electrophoresis, **8**, 93-99
- 14.) BOOTH D.R., MAHON R.J., SRIPRAKASH K.S. (1991).
DNA probes to identify members of the *Anopheles farauti* complex.
Med. Vet. Entomol., **5**, 447-454
- 15.) BOWLES J., BLAIR D., McMANUS D.P. (1992).
Genetic variants within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing.
Mol. Biol. Parasitol., **54**, 165-174
- 16.) BUDOWLE B., CHAKRABORTY R., GIUSTI A.M., EISENBERG A.J., ALLEN R.C. (1991).
Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE.
Am. J. Hum. Genet., **48**, 137-144
- 17.) BULLINI L., COLUZZI M. (1978).
Applied and theoretical significance of electrophoretic studies in mosquitoes (Diptera: Culicidae).
Parassitologia, **20**, 7-21
- 18.) BULLINI L., COLUZZI M. (1982).
Evolutionary and taxonomic inferences of electrophoretic studies in mosquitoes.
in: STEINER W.W.M., TABACHNIK W.J., RAI K.S., NARANG S. (Hrsg.), Recent Developments in the Genetics of Insect Disease Vectors, Stipes Publ. Co., Champaign, IL., SS. 465-482
- 19.) BULLINI L. (1984).
Genetic differentiation and speciation in European and African malaria vectors.
Mem. Sci. Fis. Nat., **8**, 57-69

- 20.) CANCRINI G., PIETROBELLI M., FRANGIPANE DI REGALBONO A., TAMPIERI M.P. (1997).
Mosquitoes as vectors of *Setaria labiatopapillosa*.
Int. J. Parasitol., **27**, 1061-1064
- 21.) CAPOREALE D.A., RICH S.M., SPIELMANN A., TELFORD III S.R., KOCHER T.D. (1995).
Discriminating between *Ixodes* ticks by means of mitochondrial DNS sequences.
Mol. Phylogenet. Evol., **4**, 361-365
- 22.) CDC (2001).
West Nile Virus activity – United States, 2001.
Morb. Mortal. Wkly. Rep., **51**, 497-501.
- 23.) CHARLWOOD J.D. (1996).
Biological variation in *Anopheles darlingi* Root.
Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **91**, 391-398
- 24.) CIANCHI R., SABATINI A., BULLINI L., COLUZZI M. (1980).
Divergenza genetica tra due specie gemelle del genere *Anopheles*: *An. claviger* e *An. petragrani* (Diptera: Culicidae).
Atti XII Congresso Nazionale Italia Entomologica, Roma, 261-263
- 25.) CIANCHI R., SABATINI A., BULLINI L., COLUZZI M. (1981).
Differenziazione morfologica e genetica nei complessi *Anopheles maculipennis* e *Anopheles claviger*.
Parassitologia, **23**, 158-163
- 26.) COCKBURN A.F., MITCHELL S.E., SEAWRIGHT J.A. (1990).
Cloning of the mitochondrial genome of *Anopheles quadrimaculatus*.
Arch. Insect Biochem. Physiol., **14**, 31-36
- 27.) COLLINS F.H., MENDEZ M.A., RASMUSSEN M.O., MEHAFFEY P.C., BESANSKY N.J., FINNERTY V. (1987).
A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex.
Am. J. Trop. Med. Hyg., **37**, 37-41
- 28.) COLLINS F.H., KAMAU L., RANSON H.A., VULULE J.M. (2000).
Molecular entomology and prospects for malaria control.
Bull. Wrlld. Hlth. Org., **78**, 1412-1423
- 29.) COLUZZI M. (1962).
Le forme di *Anopheles claviger* Meigen indicate con i nomi missiroli e *petragrani* sono due specie riproduttivamente isolate.
Rend. Accad. Naz. Lincei., **32**, 1025-30
- 30.) COLUZZI M., SACCA G., FELICIANGELI E.D. (1965).
Il complesso *Anopheles claviger* nella sottoregione mediterranea.
Cah. ORSTOM, Sér. Ent. Méd. Parasit., **3**, 97-102

- 31.) COLUZZI M. (1966).
Osservazioni coomperative sui chromosoma X nelle specie A e B dei complesso *Anopheles gambiae*.
Rendi. Acad. Nazi. Lincei., **40**, 671-678
- 32.) COLUZZI M., SABATINI A. (1968).
Cytogenetic observation on species C of the *Anopheles gambiae* complex.
Parassitologia, **10**, 179-184
- 33.) COLUZZI M., SABATINI A., PATRARCA V., DI DECO M.A. (1979).
Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., **72**, 483-497
- 34.) CORNEL A.J., PORTER C.H., COLLINS F.H. (1996).
Polymerase chain reaction species diagnostic assay for *Anopheles quadrimaculatus* cryptic species (Diptera: Culicidae) based on ribosomal DNA ITS2 sequences.
J. Med. Entomol., **33**, 109-116
- 35.) CRABTREE M.B., SAVAGE H.M., MILLER B.R. (1995).
Development of species-diagnostic polymerase chain reaction assay for the identification of *Culex* vectors of St. Louis encephalitis virus based on interspecies sequence variation in ribosomal DNA spacers.
Am. J. Trop. Med. Hyg., **53**, 105-109
- 36.) De MERIDA A.M.P., PALMIERI M., YURRITA M. M., MOLINA A., MOLINA E., BLACK W.C. (1999).
Mitochondrial DNA variation among *Anopheles albimanus* populations.
Am. J. Trop. Med. Hyg., **61**, 230-239
- 37.) DEL VECCHIO G. (1939).
Sulle varietà di *Anopheles claviger*.
Riv. Parassit., **3**, 27-37
- 38.) DESPRES L., IMBERT-ESTABLET D., COMBES C., BONHOMME F. (1992).
Molecular evidence linking hominid evolution to recent radiation of schistosomes (Platyhelminthes: Trematoda).
Mol. Phylogenet. Evol., **1**, 295-304
- 39.) DOCKHORN-DWORNICZAK B., DWORNICZAK B., BRÖMMELKAMP L., Büllers J, Horst J., Böcker W.W. (1991).
Non-isotopic detection of single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP): a rapid and sensitive technique in diagnosis of phenylketonuria.
Nucl. Acids Res., **19**, 2500
- 40.) DONNELLY M. J., SIMARD F., LEHMANN T. (2002).
Evolutionary studies of malaria vectors.
Trends Parasitol., **18**, 75-80

- 41.) DUNBEAR R.W., VAJIME C.G. (1981).
Cytotaxonomy of the *Similium damnosum* complex.
in: LAIRD M. (Hrsg.), Blackflies - the Future for biological Methods in Integrated Control, Academic Press, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco, SS. 31-43
- 42.) ENCINAS GRANDES A. (1982).
Taxonomia y biologia de los mosquitos del area Salmantina.
Consejo Superior de Investigaciones Cientificas, Centro de Edafologia y Biologia Aplicada.
Ediciones Universidad de Salamanca, 437 SS.
- 43.) ERITJA R., ARANDA C., PADROS J., GOULA M. (1998).
Revised checklist of the Spanish mosquitoes.
Acta Virologica Portuguesa, **5**, 25
- 44.) FAIRLEY T.L., RENAUD T.M., CONN J.E. (2000).
Effects of local geographic barriers and latitude on population structure in *Anopheles punctipennis* (Diptera: Culicidae).
J. Med. Entomol., **37**, 754-760
- 45.) FANTINI B. (1994).
Anophelism without malaria: an ecological and epidemiological puzzle.
Parassitologia, **36**, 83-106
- 46.) FOLEY D.H., BRYAN J.H. (1993).
Electrophoretic keys to identify members of the *An. punctulatus* complex of vector mosquitoes in Papua New Guinea.
Med. Vet. Entomol., **7**, 49-53
- 47.) FOURNIER D., BRIDE J.M., NAVAJAS M. (1994).
Mitochondrial DNA from spider mites: isolation, restriction map and partial sequence of the cytochrome oxidase subunit I gene.
Genetica, **94**, 73-75
- 48.) FRENCH W.L., BAKER R.H., KITZMILLER J.B. (1962).
Preparation of mosquito chromosomes.
Mosq. News, **22**, 377-383
- 49.) FRITZ G.N., CONN J., COCKBURN A., SEAWRIGHT J. (1994).
Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer 2 from populations of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae).
Mol. Biol. Evol., **11**, 406-416
- 50.) FRIZZI G. (1947).
Salivary gland chromosomes of *Anopheles*.
Nature, **160**, 226-227
- 51.) FRIZZI G. (1953).
Etude cytogénétique d'*Anopheles maculipennis* en Italie.
Bull. Wrld. Hlth. Org., **9**, 335-344

- 52.) GALE K.R., CRAMPTON J.M. (1987).
[O]DNA probes for species identification of mosquitoes in the *Anopheles gambiae* complex.
Med. Vet. Entomol., **1**, 127-136
- 53.) GASSER R.B. (1997).
Mutation scanning methods for the analysis of parasite genes.
Int. J. Paras., **27**, 1449-1463
- 54.) GENNIS R.B. (1992).
Site-directed mutagenesis studies on subunit I of the aa3-type cytochrome c oxidase of *Rhodobacter sphaeroides*: a brief review of progress to date.
Biochim. Biophys. Acta, **1101**, 184-187
- 55.) GERBI S.A. (1986).
The evolution of eukaryotic ribosomal DNA.
Biosystems, **19**, 247-258
- 56.) GRATZ N.G. (1999).
Emerging and resurging vector-borne diseases.
Annu. Rev. Entomol., **44**, 51-75
- 57.) GUY E.C., STANEK G. (1991).
Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease by the polymerase chain reaction.
J. Clin. Pathol., **44**, 610-611
- 58.) HACKETT L.W., MISSIROLI A. (1935).
The varieties of *An. maculipennis* and their relation to the distribution of malaria in Europe.
Riv. Malariologia, **14**, 45-109
- 59.) HARGREAVES E. (1923).
Entomological notes from Taranto (Italy) with references to Faenza, during 1917 and 1918.
Bull. Ent. Res., **14**, 213-219
- 60.) HARTL D.L., CLARK A.G. (1997).
Principles of population genetics.
Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, USA
- 61.) HAYASHI K. (1991).
PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA.
PCR Meth. Appl., **1**, 34-38
- 62.) HAYASHI K., YANDELL D. W. (1993).
How sensitive is PCR-SSCP?
Human Mutation, **2**, 338-346

- 63.) HISS R.H., NORRIS D.E., DIETRICH C.H., WHITCOMB R.F., WEST D.F., BESIO C.F., KAMBHAMPATI S., PIESMAN J., ANTOLIN M.F., BLACK W.C. (1994).
Molecular taxonomy using single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of mitochondrial ribosomal DNA genes.
Insect Mol. Biol., **3**, 171-182
- 64.) HUBÁLEK Z., HALOUZKA J. (1999).
West Nile fever - a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe.
Emerg. Infect. Dis., **5**, 643-650
- 65.) HUNT R.H. (1973).
A cytological technique for the study of *Anopheles gambiae* complex.
Parassitologia, **15**, 137-139
- 66.) JAENSON T.G.T., LOKKI J., SAURA A. (1986).
Anopheles (Diptera: Culicidae) and malaria in northern Europe, with special reference to Sweden.
J. Med. Entomol., **23**, 68-75.
- 67.) JETTEN T.H., TAKKEN W. (1994).
Anophelism without malaria in Europe - A review of the ecology and distribution of the genus *Anopheles* in Europe.
Wageningen Agric. Univ. Papers, 94-5
- 68.) KAMAU L., MUKABANA W.R., HAWLEY W.A., LEHMANN T., IRUNGU L.W., ORAGO A.A.S., COLLINS W.H. (1999).
Analysis of genetic variability in *Anopheles arabiensis* and *Anopheles gambiae* using microsatellite loci.
Insect Mol. Biol., **8**, 287-297
- 69.) KAMBHAMPATI S., RAI K.S. (1992).
Mitochondrial DNA variation within and among populations of the mosquito *Aedes albopictus*.
Genome, **34**, 288-292
- 70.) KAMBHAMPATI S., BLACK W. C., RAI K.S. (1992).
Random amplified polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae): Techniques, statistical analysis and applications.
J. Med. Entomol., **29**, 939-944
- 71.) KAMPEN H. (1994).
Versuche zur Identifizierung der Geschwisterarten des *Anopheles gambiae*-Komplexes (Diptera: Culicidae) mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion im Rahmen Malaria-epidemiologischer Studien in Kamerun.
Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rhein. Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

- 72.) KAMPEN H., STRAIF S., MAIER W.A., SEITZ H.M. (1995).
Comparison of PCR and cytotaxonomy in the differentiation of *Anopheles gambiae* sibling species exemplified in mosquito specimens from Cameroon.
Appl. Parasitol., **36**, 274-278
- 73.) KAMPEN H., STERNBERG A., PROFT J., BASTIAN S., SCHAFFNER F., MAIER W.A., SEITZ H.M. (2003).
Polymerase chain reaction-based differentiation of the mosquito sibling species *Anopheles claviger* s.s. and *Anopheles petragani* (Diptera: Culicidae).
Am. J. Trop. Med. Hyg., **69**, 195-199
- 74.) KAMPEN H., MALTEZOS E., PAGONAKI M., HUNFELD K.-P., MAIER W.A., SEITZ H.M. (2002).
Individual cases of autochthonous malaria in Evros Province, northern Greece: serological aspects.
Parasitol. Res., **88**, 261-266
- 75.) KASAP M. (1986).
Seasonal variation in populations of *Anopheles maculipennis*, *Anopheles claviger* and *Culex pipiens* in Turkey.
J. Am. Mosq. Control Association, **2**, 478-481
- 76.) KITZMILLER J.B., FRIZZI G., BAKER R.H. (1967)
Evolution and speciation within the *maculipennis* complex of the genus *Anopheles*.
in: PAL R., WRIGHT J.W. (Hrsg.), Genetics of Insect Vectors of Disease, Elsevier Publ., Amsterdam, London, New York, SS. 151-210
- 77.) KOEKEMOER L.L., LOCHOUARN L., HUNT R.H., COETZEE M. (1999).
Single-strand conformation polymorphism analysis for identification of four members of the *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae) group.
Entomol. Soc. Am., **36**, 125-130
- 78.) KORVENKONTIO P., LOKKI J., SAURA A., ULMANEN I. (1979).
An. maculipennis complex (Diptera: Culicidae) in Northern Europe: species diagnosis by egg structure and enzyme polymorphism.
J. Med. Entomol., **16**, 169-170
- 79.) KÜHLHORN F. (1965).
Untersuchungen über den Charakter der Brutgewässer von *Anopheles claviger* (= *bifurcatus*) in Oberbayern.
Riv. Malariol., **44**, 49-93
- 80.) KWOK S., HIGUCHI R. (1989).
Avoiding false positives with PCR.
Nature, **339**, 237-238

- 81.) LEHMANN T., HAWLEY W.A., GREBERT H., COLLINS F.H. (1998).
The effective population size of *Anopheles gambiae* in Kenya: implications for population structure.
Mol. Biol. Evol., **5**, 264-276
- 82.) LIU Q., SOMMER S.S. (1994).
Parameters affecting the sensitivities of dideoxy fingerprinting and SSCP.
Annu. Rev. Biochem., **49**, 727-764
- 83.) LONG E.O., DAWID I.B. (1980).
Alternative pathways in the processing of ribosomal RNA precursor in *Drosophila melanogaster*.
J. Mol. Biol., **138**, 873-878
- 84.) LUNT D.H., ZHANG D.-X., SZYMURA J.M., HEWITT G.M. (1996).
The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies.
Insect Mol. Biol., **5**, 153-165
- 85.) LUPASCU G. (1941).
Sull'esistenza di due varietà di *Anopheles claviger*.
Riv. Parassit., **5**, 25-44
- 86.) MacDONALD G. (1957).
The epidemiology and control of malaria.
Oxford University Press, London
- 87.) MAHON R.J., GREEN C.A., HUNT R.H. (1976).
Diagnostic alloenzymes for routine identification of adults of the *Anopheles gambiae* complex (Diptera: Culicidae).
J. Med. Entomol., **66**, 25-31
- 88.) MAJORI G., SABATINELLI G., KONDRACHINE V. (1999).
Re-emerging malaria in the WHO European region: control priorities and constraints.
Parassitologia, **41**, 327-328
- 89.) MATHIEU B., SCHAFFNER F. (2001).
Morphological differentiation of larvae and pupae among *Anophelinae* species of the *claviger* complex.
3. Int. Congr. der "Society of Vector Ecologists", Barcelona, Spanien, 16.-21. Sept. 2001
- 90.) MAYR E. (1967).
Artbegriff und Evolution
P. Parey, Hamburg, Berlin
- 91.) McLAIN D.K., WESSON D.M., COLLINS F.H., OLIVER J.H. Jr. (1995).
Evolution of the rDNA spacer, ITS2, in the ticks *Ixodes scapularis* and *I. pacificus* (Acari: Ixodidae).
Heredity, **75**, 303-319

- 92.) MILES S.J. (1978).
Enzyme variation in the *An. gambiae* Giles group of species (Diptera: Culicidae).
Bull. Ent. Res., **68**, 85-96
- 93.) MOHRIG W. (1969).
Die Culiciden Deutschlands.
Parasitol. Schriftenreihe, Jena, 260 SS.
- 94.) MURGUE B., MURRI S., ZIENTARA S., DURAND B., DURAND J.-P., ZELLER H. (2001).
West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years.
Emerg. Infect. Dis., **7**, 692-696
- 95.) NAGYLAKI T. (1975).
Conditions for the existence of clines.
Genetics, **80**, 595-615
- 96.) NARANG S.K., KAISER P.E., SEAWRIGHT J.H. (1989).
Dichotomous electrophoretic taxonomic key for identification of sibling species A, B and C of the *Anopheles quadrimaculatus* complex (Diptera: Culicidae).
J. Med. Entomol., **26**, 94-99
- 97.) NAVAJAS M., GUTIERREZ J., BONATO O., BOLLAND H.R., MAPANGOU-DIVASSA S. (1994).
Intraspecific diversity of the cassava green mite *Mononychellus progressivus* (Acari: Tetranychidae) using comparisons of the mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences and cross-breeding.
Exp. Appl. Acarol., **18**, 351-360
- 98.) NAVAJAS M., FOURNIER D., LAGNEL J., GUTIERREZ J., BOURSOT P. (1996).
Mitochondrial CO1 sequences in mites: evidence for variations in base composition.
Insect Mol. Biol., **5**, 281-285
- 99.) NAVAJAS M., LAGNEL J., GUTIERREZ J., BOURSOT P. (1998).
Species-wide homogeneity of nuclear ribosomal ITS2 sequences in the spider mite *Tetranychus urticae* contrasts with extensive mitochondrial CO1 polymorphism.
Heredity, **80**, 742-752
- 100.) OLSEN G.J., WOESE C.R. (1993).
Ribosomal RNA: A key to phylogeny.
FASEB J., **7**, 113-123

- 101.) ORITA M., IWAHANA H., KANAZAWAT H., HAYASHI K., SEKIYA T. (1989a).
Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis and single-strand conformation polymorphism.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 2766-2770
- 102.) ORITA M., SUZUKI Y., SEKIYA T., HAYASHI K. (1989b).
Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction.
Genomics, **5**, 874-879
- 103.) PANYIM S., YASOTHORNSRIKUL S., TUNGPRADUBKUL S., BAIMAI V., ROSENBERG R., ANDRE R.G., GREEN C.A. (1988).
Identification of isomorphic malaria vectors using a DNA probe.
Am. J. Trop. Med. Hyg., **38**, 47-49
- 104.) PASKEWITZ S.M., WESSON D.M., COLLINS F.H. (1993).
The internal transcribed spacers of ribosomal DNA in five members of the *Anopheles gambiae* species complex.
Insect Mol. Biol., **2**, 247-257
- 105.) PASKEWITZ S.M., COLLINS F.H. (1997).
PCR amplification of insect ribosomal DNA. Disease Vectors. A Methods Manual.
In: CRAMPTON J.M., BEARD C.B. & LOUIS C. (Hrsg.), The Molecular biology of insect Verlag Chapman & Hall, London, Weinheim, New York, Tokio, Melbourne, Madras, SS. 374-383
- 106.) PCHELKINA A.A., SELEDTSOV I.I. (1978).
Experimental studies of the relationship between Tahyna virus and mosquitoes [Russisch].
Med. Parazit. Parazit. Bolez, **47**, 59-63
- 107.) PEUS F. (1942).
Die Fiebermücken des Mittelmeergebietes.
P. Schöps, Leipzig
- 108.) PIRES C.H., RIBEIRO H., CAPELA R.A., RAMOS H.C. (1982).
Research on the mosquitoes of Portugal (Diptera: Culicidae). VI – The mosquitoes of Alentejo.
An. Inst. Hig. Med. Trop., **8**, 79-102
- 109.) PORTER C.H., COLLINS F.H. (1991).
Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae).
Am. J. Trop. Med. Hyg., **45**, 271-279
- 110.) POSTIGLIONE M., TABANLI S., RAMSDALE C.D. (1972).
Anopheles claviger in Turkey.
Riv. Parassit., **33**, 219-230

- 111.) POSTIGLIONE M., TABANLI S., RAMSDALE C.D. (1973).
The *Anopheles* of Turkey.
Riv. Parassit., **34**, 128-157
- 112.) PROFT J., MAIER W. A., KAMPEN H. (1999).
Identification of six sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) by a polymerase chain reaction assay.
Parasitol. Res., **85**, 837-843
- 113.) PROFT J. (2001).
Identifizierung, Verbreitung und Ökologie von Geschwisterarten des *Anopheles maculipennis*- und des *Anopheles claviger*-Komplexes.
Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rhein. Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- 114.) RAMOS H.C., RIBEIRO H., PIRES C.H., CAPELA R.A. (1977/78).
Research on the mosquitoes of Portugal (Diptera: Culicidae). II – The mosquitoes of the Algarve.
An. Inst. Hig. Med. Trop., **5**, 237-256
- 115.) RAMSDALE C., SNOW K. (2000).
Distribution of the genus *Anopheles* in Europe.
Eur. Mosq. Bull., **7**, 1-26
- 116.) REY D., DESPRÉS L., SCHAFFNER F., MEYRAN J.-C. (2001).
Mapping of resistance to vegetable polyphenols among *Aedes* taxa (Diptera: Culicidae) on a molecular phylogeny.
Mol. Phylogenet. Evol., **19**, 317-325
- 117.) RIBEIRO H., RAMOS H.C., PIRES C.H., CAPELA R.A. (1988).
An annotated checklist of the mosquitoes of continental Portugal (Diptera: Culicidae).
Actas III Congreso Ibérico de Entomologia, 233-254
- 118.) ROMI R., PONTUALE G., SABATINELLI G. (1997).
Le zanzare italiane: generalità e identificazione degli stadi preimaginali (Diptera: Culicidae).
Fragm. Entomol. (Roma), **29**, 1-141
- 119.) SAIKI R.K., SCHARF S., FALOONA F., MULLIS K.B., HORN G.T., ERLICH H.A., ARNHEIM N. (1985).
Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.
Science, **230**, 1350-1354
- 120.) SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., HORN G.T., MULLIS K.B., EHRlich H.A. (1988).
Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostabile DNA polymerase.
Science, **239**, 487-491

- 121.) SALLUM M.A.M., SCHULTZ T.R., FOSTER P.G., ARONSTEIN K., WIRTZ R.A., WILKERSON R.C. (2002).
Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicidae) based on nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences.
Syst. Entom., **27**, 361-382
- 122.) SALOMONE N., FRATI F., BERNINI F. (1996).
Investigations on the taxonomic status of *Steganacarus magnus* and *Steganacarus anomalus* (Acari: Oribatida) using mitochondrial DNA sequences.
Exp. Appl. Acarol., **20**, 607-615
- 123.) SANGER F., NICKLEN S., COULSON A.R. (1977).
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 5463-5467
- 124.) SCHAFFNER F. (1998).
A revised checklist of French mosquitoes.
Eur. Mosq. Bull., **2**, 1-9
- 125.) SCHAFFNER F., RAYMOND M., PASTEUR N. (2000).
Genetic differentiation of *Anopheles claviger* s.s. in France and neighbouring countries.
Med. Vet. Entomol., **14**, 264-27
- 126.) SCHLÖTTERER C., HAUSER M.T., VON HAESELER A., TAUTZ D. (1994).
Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*.
Mol. Biol. Evol., **11**, 513-522
- 127.) SCHÖLER A. (2003).
Untersuchungen zur Biologie und Ökologie der Herbstmilbe *Neotrombicula autumnalis* (Acari: Trombiculidae) im Hinblick auf Bekämpfungsmöglichkeiten sowie zu ihrer Bedeutung als Vektor der Borreliose.
Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rhein. Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- 128.) SCOTT J.A., BROGDON W.G., COLLINS F.H. (1993).
Identification of single specimens of the *Anopheles gambiae* complex by the polymerase chain reaction.
Am. J. Trop. Med. Hyg., **49**, 520-529
- 129.) SENEVET G., ANDARELLI L. (1955).
Races et variétés de l'*Anopheles claviger* (Meigen, 1804).
Arch. Institut Pasteur d'Algérie, **33**, 128-137
- 130.) SERVICE M.W. (1971).
A reappraisal of the role of mosquitoes in the transmission of myxomatosis in Britain.
J. Hyg. (Camb.), **69**, 105-111

- 131.) SEVERINI C., SILVESYRINI P., LA ROSA G., MARINUCCI M. (1996).
Sequenze and secondary structure of the rDNA second internal transcribed spacer in the sibling species *Culex pipiens* L. and *Cx. quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae).
Insect Mol. Biol., **5**, 181-186
- 132.) SHARPE R.G., HIMS M.M., HARBACH R.E., BUTLIN R.K. (1999).
PCR-based methods for identification of species of the *Anopheles minimus* group: allele-specific amplification and single-strand conformation polymorphism.
Med. Vet. Entomol., **13**, 265-273
- 133.) SHEFFIELD V. C., BECK J. S., KWITEK A. E., SANDSTROM D. W., STONE E. M. (1993).
The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions.
Genomics, **16**, 325-332
- 134.) SIMARD F., FONTENILLE D., LEHMANN T., GIROD R., BRUTUS L., GOPAUL R., DOURNON C., COLLINS F.H. (1999).
High amounts of genetic differentiation between populations of the malaria vector *Anopheles arabiensis* from West Africa and eastern outer islands.
Am. J. Trop. Med. Hyg., **60**, 1000-1009
- 135.) SINGER M., BERG P. (1992).
Gene and Genome.
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York
- 136.) SLATKIN M. (1993).
Gene flow and population structure.
In: REAL L.A. (Hrsg.), Ecological Genetics, Princeton University Press, SS. 13-17
- 137.) STEGNII V.N., KABANOVA V.M. (1978).
Cytoecological study of indigenous populations of the malaria mosquito in the territory of the U.S.S.R.: I. Identification of a new species of *Anopheles* in the *maculipennis* complex by the cytodiagnostic method.
Mosq. Syst., **10**, 1-12
- 138.) STEGNII V.N. (1982).
Genetic adaption and speciation in sibling species of the Eurasian *maculipennis* complex.
in: STEINER W.W.M., TABACHNIK W.J., RAI K.S., NARANG S. (Hrsg.), Recent Developments in the Genetics of Insect Disease Vectors. Stipes Publ. Co., Champaign, IL, SS. 454-464
- 139.) STEGNII V.N. (1987).
Systematic reorganization of the architectonics of polytene chromosomes during ontogeny and phylogeny of malaria mosquitoes. I. Differences in the nuclear structure of the somatic and generative tissues.

- Genetica, **23**, 821-826
- 140.) SUCHARIT S., KOMALAMISRA N. (1997).
Differentiation of *Anopheles minimus* species complex by RAPD-PCR technique.
J. Med. Assoc. Thai., **80**, 598-602
- 141.) SUTHERST R.W. (1993).
Arthropods as disease vectors in a changing environment.
in: Environmental Change and Human Health. Ciba Foundation Symposium 175, Wiley, Chichester, SS. 124-145
- 142.) TABACHNICK W.J., BLACK W.C. (1995).
Making a case for molecular population genetic studies of arthropod vectors.
Parasitol. Today, **11**, 27-30
- 143.) TANG J., TOÈ L., BACK C., UNNASCH T. R. (1996).
Intraspecific heterogeneity of the rDNA internal transcribed spacer in the *Simulium damnosum* (Diptera: Simuliidae) complex.
Mol. Biol. Evol., **13**, 244-254
- 144.) TAYLOR C., TOURÉ Y.T., CARNAHAN J., NORRIS D.E., DOLO G., TRAORÉ S.F., EDILLO F.E., LANZARO G.C. (2000).
Gene flow among populations of the malaria vector, *Anopheles gambiae*, in Mali, West Africa.
Genetics, **157**, 743-750
- 145.) vanTHIEL P.H. VAN (1927).
Sur l'origine des variations de taille de l'*Anopheles maculipennis* dans les Pays-bas.
Bull. Soc. Pathol. Exot., **20**, 366
- 146.) TRAAVIK T., MEHL R., WIGER R. (1985).
Mosquito-borne arboviruses in Norway. Further isolations and detections of antibodies to California encephalitis viruses in human, sheep and wildlife sera.
J. Hyg. (Camb.), **94**, 111-122
- 147.) TRIPET F., TOURÉ Y.T., TAYLOR C.E., NORRIS D.E., DOLO G., LANZARO G.C. (2001).
DNA analysis of the transferred sperm reveals significant levels of gene flow between molecular forms of *Anopheles gambiae*.
Mol. Ecol., **10**, 1725-1732
- 148.) VOGLER A.P., DESALLE R. (1994).
Evolution and phylogenetic information content of the ITS-1 region in the tiger beetle *Cicindela dorsalis*.
Mol. Biol. Evol., **11**, 393-405

- 149.) WALTON C., HANDLEY J.M., TUN- LIN W., COLLINS F.H., HARBACH R.E., BAIMAI V., BUTLIN R.K. (2000).
Population structure and population history of *Anopheles dirus* mosquitoes in Southeast Asia.
Mol. Biol. Evol., **17**, 962-974
- 150.) WESSON D.M., PORTER C.H., COLLINS F.H. (1992).
Sequence and secondary structure comparisons of the ITS rDNA in mosquitoes (Diptera: Culicidae).
Mol. Phyl. Evol., **1**, 253- 269
- 151.) WESSON D.M., McLAIN D.K., OLIVER J.H., PIESMAN J., COLLINS F.H. (1993).
Investigation of the validity of species status of *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) using rDNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**, 10221-10225
- 152.) WEYER F. (1942).
Bestimmungsschlüssel für die *Anopheles*-Weibchen und –Larven in Europa, Nordafrika und Westasien.
Dtsch. Tropenmed. Zschr., **46**, 1-35
- 153.) WHITE G.B., COLUZZI M., ZAHAR A.R. (1975).
Review of cytogenetic studies on *anopheline* vectors of malaria.
WHO Techn. Rep. Mal./75849, Annex 2, 14-20
- 154.) WHITE G.B. (1978).
Systematic reappraisal of the *An. maculipennis* complex.
Mosq. Syst., **10**, 13-44
- 155.) WRIGHT S. (1943).
Isolation by distance.
Genetics, **28**, 114-138
- 156.) XU J.N., QU F.Y. (1997).
Ribosomal RNA differences between species A and D of the *Anopheles dirus* complex of mosquitoes in China.
Med. Vet. Entomol., **11**, 134-138
- 157.) ZAMBURLINI R., CARGNUS E. (1998).
Il complesso *Anopheles claviger* (Diptera: Culicidae) nell'Italia nord-orientale.
Parassitologia, **40**, 347-351

Publikation

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht in:

Kampen H., Sternberg A., Proft J., Bastian S., Schaffner F., Maier W.A., Seitz H.M. (2003).

Polymerase chain reaction-based differentiation of the mosquito sibling species *Anopheles claviger* s.s. and *Anopheles petragrani* (Diptera: Culicidae).

Am. J. Trop. Med. Hyg., **69**, 195-199

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Fundorte von <i>An. claviger</i> s.s. innerhalb Europas (RAMSDALE & SNOW 2000)	6
Abb. 2:	Fundorte von <i>An. petragani</i> innerhalb Europas (RAMSDALE & SNOW 2000)	6
Abb. 3:	Die Eihüllenstruktur der Geschwisterarten des <i>An. claviger</i> -Komplexes (SENEVET & ANDARELLI 1955)	7
Abb. 4:	a) 2. Antepalmarhaar des 4. Abdominalsegmentes der Larve von <i>An. claviger</i> s.s. b) 2. Antepalmarhaar des 4. Abdominalsegmentes der Larve von <i>An. petragani</i> c) 0. Haar des 6. Abdominalsegmentes der Puppe von <i>An. claviger</i> s.s. d) 0. Haar des 6. Abdominalsegmentes der Puppe von <i>An. petragani</i> (MATHIEU B. & SCHAFFNER F. 2001)	8
Abb. 5:	Larve von <i>An. claviger</i> s.s. - Kopf mit Klypeal- und Fronthaaren (MOHRIG 1969)	9
Abb. 6:	Spezifische Gengruppe der rDNA	14
Abb. 7:	Schema der mitochondrialen DNA am Beispiel von <i>An. gambiae</i> . Es werden Position und Orientierung jedes Gens gezeigt (BEARD et al. 1993)	16
Abb. 8:	Vergleich der ITS2-Sequenzen von <i>An. claviger</i> s.s. (AC) und <i>An. petragani</i> (AP)	44
Abb. 9:	Amplifikate von <i>An. claviger</i> s.s. von Is 1-4 (a) und <i>An. petragani</i> von Serrania 1-4 (b)	46
Abb. 10:	Amplifikate von <i>An. claviger</i> s.s. (269 bp) und <i>An. petragani</i> (367 bp) nach Multiplex-PCR	48
Abb. 11:	PCR-Produkte von <i>An. beklemeshevi</i> , <i>An. claviger</i> s.s. und <i>An. petragani</i>	49
Abb. 12:	Amplifikate der ND4-Region von <i>An. claviger</i> s.s.	52
Abb. 13:	Lage der Primer ND4ar, ND4ar ₂ , ND4c und ND4c ₂ am Beispiel der ND4-Region von Individuum 1655VI aus der Population Oise	53
Abb. 14:	Amplifikate der beiden ND4-Teilregionen von <i>An. claviger</i> s.s.	54

Abb. 15:	Restriktionsspaltung der ND4-Amplifikate von <i>An. claviger</i> s.s. mittels des Restriktionsenzym <i>DraI</i> , beispielhaft anhand der Mücken 1-6 der Population Bonn (BN)	55
Abb. 16:	Schnittstellen der ND4-Region von <i>An. claviger</i> s.s. durch die Restriktionsendonuklease <i>DraI</i>	56
Abb. 17:	PAGE der Amplifikate aus der ND4-Region von <i>An. claviger</i> s.s. der Population Charolais (Ch), 1. Durchgang	59
Abb. 18:	PAGE der Amplifikate aus der ND4-Region von <i>An. claviger</i> s.s. der Population Charolais (Ch), 2. Durchgang	59
Abb. 19:	PAGE der Amplifikate aus der ND4-Region von <i>An. claviger</i> s.s. der Population Bonn (BN), 1. Durchgang	59
Abb. 20:	PAGE der Amplifikate aus der ND4-Region von <i>An. claviger</i> s.s. der Population Bonn (BN), 2. Durchgang	60
Abb. 21:	PAGE der Amplifikate aus der ND4-Region von <i>An. claviger</i> s.s. der Population Holland (H), 1. Durchgang	61
Abb. 22:	PAGE der Amplifikate aus der ND4-Region von <i>An. claviger</i> s.s. der Population Holland (H), 2. Durchgang	62
Abb. 23:	PAGE der Amplifikate aus der ND4-Region von <i>An. claviger</i> s.s. der Population Millevaches (Mv), 1. Durchgang	63
Abb. 24:	Die PAGE der Amplifikate aus der ND4-Region von <i>An. claviger</i> s.s. der Population Millevaches (Mv), 1. Durchgang	64
Abb. 25:	PAGE der Amplifikate aus der ND4-Region von <i>An. claviger</i> s.s. der Populationen Millevaches (Mv), Holland (H), Charolais (Ch) und Schwarzwald (Sw)	65
Abb. 26:	PAGE der Amplifikate aus der ND4-Region von <i>An. claviger</i> s.s. der Population Schwarzwald (Sw), 1. Durchgang	66
Abb. 27:	PAGE der Amplifikate aus der ND4-Region von <i>An. claviger</i> s.s. der Population Schwarzwald (Sw), 2. Durchgang	66

Abb. 28:	Nukleotidsequenzvergleich der ND4-Region von <i>An. claviger</i> s.s. der Populationen Charolais (Ch), Millevaches (Mv), Bonn (BN), Salzburg (Sb), Schwarzwald (Sw) und Holland (H)	71
Abb. 29:	Amplifikate der CO1-Region von <i>An. claviger</i> s.s.	73
Abb. 30:	Sequenz der CO1-Region von <i>An. claviger</i> s.s. in 5'→3'-Richtung mit den dazugehörigen Primern 772 und 773	74
Abb. 31:	Schnittstellen in der CO1-Region von <i>An. claviger</i> s.s. durch die Restriktionsendonuklease <i>ApoI</i>	75
Abb. 32:	Restriktion der CO1-Region von <i>An. claviger</i> s.s. mittels der Restriktionsendonuklease <i>ApoI</i> nach einer Inkubationszeit von 8h	76
Abb. 33:	Restriktion der CO1-Amplifikate von <i>An. claviger</i> s.s. mittels der Restriktionsendonuklease <i>ApoI</i> nach einer Inkubationszeit von 5h 30 min	77
Abb. 34:	PAGE der Amplifikate der CO1-Region von <i>An. claviger</i> s.s. der Population Bonn (BN) nach Restriktionsspaltung mit dem Enzym <i>ApoI</i> für 10h	78
Abb. 35:	PAGE der Amplifikate der CO1-Region von <i>An. claviger</i> s.s. der Population Bonn (BN) nach Restriktionsspaltung mit dem Enzym <i>ApoI</i> für 8h	79
Abb. 36:	PAGE der Amplifikate der CO1-Region von <i>An. claviger</i> s.s. der Population Charolais (Ch) nach Restriktionsspaltung mit dem Enzym <i>ApoI</i> für 5h bzw. 5h 30 min; 1. Spur jeder Probe nach 5h Inkubationszeit, 2. Spur jeder Probe nach 5h 30 min Inkubationszeit	80
Abb. 37:	PAGE der Amplifikate der CO1-Region von <i>An. claviger</i> s.s. der Population Charolais (Ch) nach Restriktionsspaltung mit dem Enzym <i>ApoI</i> für 5 h 30 min	81
Abb. 38:	PAGE der Amplifikate der CO1-Region von <i>An. claviger</i> s.s. der Population Salzburg (Sb), 1. Durchgang	82
Abb. 39:	Fundorte von <i>An. beklemeshevi</i> innerhalb Europas (RAMSDALE & SNOW 2000)	86

10 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Herkunft der <i>Anopheles claviger</i> s.l. Individuen und morphologische Identifizierung	18
Tab. 2:	Anzahl, Herkunft und Bezeichnung der Populationen, der für die SSCP der ND4-Region verwendeten Mücken	33
Tab. 3:	Charakteristika der Primer der artspezifischen PCR	45
Tab. 4:	Resultate der artdiagnostischen PCR im Vergleich mit der morphologischen Vorbestimmung	51
Tab. 5:	Charakteristika der Primer für die Sequenzierung der ND4-Region	54
Tab. 6:	Proben mit SSCP-Bandenmustern, die im Vergleich zu den anderen Mücken auf demselben Gel Unterschiede in einem oder mehreren von maximal vier Untersuchungsdurchgängen aufwiesen; hier: Populationen mit höchstens fünf untersuchten Individuen	68
Tab. 7:	Proben mit SSCP-Bandenmustern, die im Vergleich zu den anderen Mücken auf demselben Gel Unterschiede in einem oder mehreren von maximal drei Untersuchungsdurchgängen aufwiesen; hier: Populationen mit mindestens 25 untersuchten Individuen	68
Tab. 8:	Länge, Guanodin-Cytosin (GC)-Gehalt und Variabilität der ITS2-Region von verschiedenen Artkomplexen bzw. –Gruppen	84

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. W.A. Maier für die Überlassung des Themas sowie für die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit am Institut für Medizinische Parasitologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Bei Herrn Prof. Dr. H. Zahner möchte ich mich herzlich für die Ermöglichung dieser externen Arbeit bedanken. Zudem danke ich ihm für sein Interesse und die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. H. Kampen für die Einführung in das Fachgebiet der Molekularbiologie, die hervorragende Betreuung und die fortwährende intensive Durchsicht und Korrektur der schriftlichen Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. H.-M. Seitz danke ich für die freundliche Aufnahme am Institut für Medizinische Parasitologie und für die Überlassung eines Arbeitsplatzes.

Vielen Dank an Frau Dr. I. Reiter-Owona für die interessanten wissenschaftlichen Diskussionen und die stete Hilfsbereitschaft.

Den Doktoranden, Diplomanden und Mitarbeitern des Institutes danke ich ganz herzlich für die sehr angenehme Atmosphäre und die große Unterstützung während meiner gesamten Zeit am Institut.

Für die Bereitstellung des Mückenmaterials, als Grundlage für meine Arbeit, möchte ich mich bei Dr. F. Schaffner, R. Geene, Dr. H. Schnur und Dr. J. Proft herzlich bedanken.

Meinen Freunden, und allen die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, danke ich für die große Geduld und die unbeirrte Unterstützung.

Zu guter Letzt möchte ich mich besonders bei meiner Familie bedanken, die mich während des Studiums und der Promotion so tatkräftig unterstützt hat und ohne die alles gar nicht möglich gewesen wäre.